

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters
und der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie und -psychotherapie
der Philipps-Universität Marburg

Genetische Ursachen der Adipositas bei Kindern und Jugendlichen:
**Sequenzvarianten in Kandidatengenen der Leptin-Signalkaskade
bei extrem übergewichtigen Kindern und Jugendlichen
sowie untergewichtigen Kontrollpersonen**

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Katja Hölder
aus Warstein
2007

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Jöckel

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hebebrand

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dietmar Lohmann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Februar 2007

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Adipositas	1
1.1.1	Definition und Klassifikation	1
1.1.2	Prävalenz bei Kindern und Jugendlichen	3
1.1.3	Ursachen für die Zunahme der Adipositasprävalenz.....	4
1.1.4	Medizinische Bedeutung	5
1.2	Mechanismen der Körpergewichtsregulation.....	6
1.2.1	Anatomie der Gewichtsregulation.....	6
1.2.2	Zentraler Regelkreis der Gewichtsregulation.....	7
1.2.3	Periphere Regulation der Nahrungsaufnahme.....	8
1.3	Genetische Determination des Körpergewichts	12
1.3.1	Formalgenetische Befunde	12
1.3.2	Molekulargenetische Befunde im Tiermodell.....	13
1.3.3	Molekulargenetische Befunde beim Menschen.....	15
1.4	Ansätze zur Identifizierung Adipositas-relevanter Gene.....	17
1.4.1	Adipositas als komplexer Phänotyp	17
1.4.2	Kopplungsuntersuchungen	18
1.4.3	Kandidatengenansatz	19
1.5	Kandidatengene des Leptin-Signalweges.....	20
1.5.1	Leptinresistenz und Adipositas.....	20
1.5.2	Die Leptin-Signalkaskade.....	21
1.5.3	Interaktionen mit dem Insulin-Signalweg	24
1.5.4	Regulation des Leptin-Signals.....	25
1.6	Zielsetzung der Arbeit	26

2	MATERIAL UND METHODEN	28
2.1	Probandenkollektiv	28
2.1.1	Rekrutierung der Probanden	28
2.1.2	Deskriptive Statistik der Studiengruppen	29
2.2	in silico Genanalysen	28
2.2.1	Allgemeine Informationsquellen	28
2.2.2	Analyse von Datenbank-SNPs	28
2.2.3	Auswahl von Oligonukleotid-Primern und Restriktionsenzymen	29
2.2.4	Promoter Vorhersagen und Analyse von Promoterelementen	29
2.3	Gewinnung und Aufarbeitung von DNA-Proben	29
2.4	in-vitro Genamplifizierung mittels PCR	31
2.4.1	Auswahl von Oligonukleotid-Primern	31
2.4.2	Durchführung der PCR	32
2.4.3	Optimierung der PCR-Reaktion	33
2.5	Agarose Gelelektrophorese	36
2.6	Mutationsscreening	37
2.6.1	Einzelstrangkonnformations-Analyse	37
2.6.2	DNA Sequenzanalyse	40
2.7	SNP-Genotypisierung	41
2.7.1	Restriktionsfragment Längenpolymorphismus	41
2.7.2	Allelspezifische PCR	42
2.7.3	MALDI-TOF Massenspektrometrie	44
2.8	Validierung der Genotypen und Datenverwaltung	45
2.9	Statistische Methoden	45
2.9.1	Fall-Kontroll Assoziationstests	46
2.9.2	Test auf Transmissions-Ungleichgewicht	48
2.9.3	Statistische Teststärke	50
2.9.4	Hardy-Weinberg Gleichgewicht	51

3	ERGEBNISSE	52
3.1	in silico Analyse der Kandidatengene	52
3.1.1	Genstruktur und bekannte SNPs von <i>SOCS-3</i> , <i>IRS-1</i> und <i>IRS-2</i>	52
3.1.2	Kandidatengene für die SNP-Analyse	55
3.2	Mutationsdetektion im <i>SOCS-3</i> Gen	57
3.2.1	Identifizierte Sequenzvarianten im <i>SOCS-3</i> Promoterbereich	57
3.2.2	Genotypisierung der <i>SOCS-3</i> Variante -1044C>A	62
3.2.3	Genotypisierung der <i>SOCS-3</i> Variante -920C>A	63
3.3	Genotypisierung der Varianten <i>IRS-1</i> Arg972Gly und <i>IRS-2</i> Gly1057Asp	63
3.4	SNP-Analyse weiterer Kandidatengene	65
3.5	Statistische Befunde	66
3.5.1	Assoziationsanalyse der Varianten -1044C>A und -920C>A in <i>SOCS-3</i>	66
3.5.2	Pedigree Disequilibrium Test von <i>SOCS-3</i> -1044C>A	67
3.5.3	Assoziationsanalyse von <i>IRS-1</i> Arg972Gly und <i>IRS-2</i> Gly1057Asp	67
3.5.4	Kandidatengene der SNP-Analyse: Assoziationstest und TDT	68
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	76
4	DISKUSSION	77
4.1	Bewertung des Kandidatengenansatzes	77
4.2	Analyse des Kandidatengens <i>SOCS-3</i>	78
4.2.1	Genstruktur und Promoter	81
4.2.2	Identifizierte Varianten und Assoziationsergebnisse	81
4.2.3	Zusammenfassende Bewertung der Befunde	86
4.3	Analyse der Kandidatengene <i>IRS-1</i> und <i>IRS-2</i>	86
4.3.1	Relevanz der ausgewählten Datenbank-SNPs	88
4.3.2	Assoziationsergebnisse	89

4.4	Strategische SNP-Analyse weiterer Kandidatengene.....	90
4.4.1	Kandidatengene und Assoziationsergebnisse.....	90
4.4.2	Zusammenfassende Bewertung der Befunde	95
4.5	Auswahl der Studienkollektive.....	97
4.6	Bewertung der statistischen Methoden.....	98
4.7	Methodische Fehlerquellen.....	100
5	ZUSAMMENFASSUNG	103
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	104
7	ANHANG	I
	DNA- und Proteinsequenzen.....	i
	Abbildungsverzeichnis	vi
	Tabellenverzeichnis.....	viii
	Verwendete Abkürzungen	ix
	Verzeichnis der Groß- und Kleingeräte.....	xii
	Verwendete Puffer und Chemikalien	xiii
	Danksagung	xiv
	Curriculum vitae	xv

1 Einleitung

Die Prävalenz von Adipositas nimmt weltweit dramatisch zu und stellt aktuell eines der vordringlichsten gesundheitsbezogenen Probleme dar. Es wird geschätzt, dass mittlerweile weltweit mehr Menschen an den Folgen von Übergewicht und Adipositas sterben als an den Folgen von Unterernährung. Vor diesem Hintergrund ist es verständlich, dass die Erforschung der Körpergewichtsregulation zurzeit intensiv vorangetrieben wird.

Auch wenn sich die Pathogenese der Adipositas zunächst trivial darstellt, verbirgt sich dahinter offenbar ein sehr komplexes Geschehen, welches bislang nur unvollständig verstanden ist. Das Ziel moderner Adipositas-Forschung ist es, Gene zu identifizieren, die über eine Beeinflussung des Ernährungs- und Bewegungsverhaltens an der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase beteiligt sind. Unter der Vorstellung, dass eine Variabilität dieser Gene zu einer genetischen Prädisposition beiträgt, wurden bislang zahlreiche solcher Kandidatengene auf eine Assoziation mit Adipositas untersucht. Dahinter verbirgt sich die Hoffnung, dass neue Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen zu einem erweiterten Verständnis der Pathophysiologie der Adipositas führen und Möglichkeiten zur Entwicklung therapeutischer Interventionsmöglichkeiten bieten.

1.1 Adipositas

1.1.1 Definition und Klassifikation

Als Adipositas bezeichnet man einen für Lebensalter und Geschlecht überdurchschnittlichen Anteil des Fettgewebes am Gesamtkörpergewicht (Gray 1989). Da die exakte Bestimmung der Körperfettmasse nur mit aufwendigen und kostspieligen Methoden möglich ist, gibt es zahlreiche indirekte Methoden wie Hautfaltenmessungen und verschiedene Körpergewichts-Körperlängen Indizes. In epidemiologischen Studien hat sich in den letzten Jahren die Verwendung des Körpermassenindex (*Body Mass Index*, BMI) zur Klassifikation von Übergewicht und Adipositas durchgesetzt:

$$\text{BMI} = \frac{\text{Körpergewicht (kg)}}{\text{Körperlänge (m}^2\text{)}}$$

Der BMI weist eine hohe Korrelation mit dem Körpergewicht und der Fettmasse (Dietz und Robinson 1998; Killeen *et al.* 1978) bei geringer Korrelation mit der Körperlänge

(Watson *et al.* 1979) auf und kann somit als relativ zuverlässiges Instrument zur Abschätzung der Körperfettmasse herangezogen werden (Hebebrand *et al.* 1994).

Die Definition von Adipositas erfordert eine Festlegung, ab welchem Ausmaß eine erhöhte Fettmasse vorliegt. Bezogen auf das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko hat die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation*, WHO) in Abhängigkeit vom BMI verschiedene Gewichtsklassen festgelegt. Hiernach wird ein BMI über 30 kg/m² als Adipositas und ein BMI über 40 kg/m² als extreme Adipositas bezeichnet (WHO 1998; s. *Tabelle 1-1*).

Gewichtsklasse		BMI (kg/m ²)
Untergewicht		< 18,5
Normalgewicht		18,5 - 24,9
Übergewicht		25,0 - 29,9
Adipositas	Grad 1	30,0 - 34,9
	Grad 2	35,0 - 39,9
	Grad 3	≥ 40,0

Tabelle 1-1: Einteilung der Gewichtsklassen in Abhängigkeit vom BMI (WHO 1998).

Diese risikobezogenen BMI-Grenzwerte können bei Kindern und Jugendlichen nur eingeschränkt angewendet werden, da durch Wachstum und Pubertätsentwicklung und den damit verbundenen Veränderungen der Körperzusammensetzung der BMI typischen alters- und geschlechtsspezifischen Schwankungen unterliegt (Gray 1989). Ebenso bleiben bei der Verwendung des BMI kulturelle Unterschiede unberücksichtigt. Aus diesem Grund werden für verschiedene Populationen Perzentilenkurven ermittelt, die es ermöglichen, den errechneten BMI in Bezug zur jeweiligen geschlechtsspezifischen Alterspopulation zu setzen (Hebebrand *et al.* 1994).

Die aktuell verwendeten BMI-Referenzwerte für deutsche Kinder und Jugendliche basieren auf Querschnittsdaten von 17 147 Jungen und 17 275 Mädchen aus 17 Untersuchungen in verschiedenen Regionen Deutschlands (Kromeyer-Hauschild *et al.* 2001). Die Arbeitsgemeinschaft für Adipositas im Kindes- und Jugendalter (AGA, URL <http://www.a-g-a.de>) hat anhand dieser BMI-Perzentilenkurven die 90. bzw. die 97. alters- und geschlechtsspezifische Perzentile als Grenzwerte für die Definition von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen empfohlen (s. *Abbildung 1-1*; Kromeyer-Hauschild *et al.* 2001). Diese Perzentilen ermöglichen, den Stand von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland zu vergleichen und in den kommenden Jahren zu verfolgen.

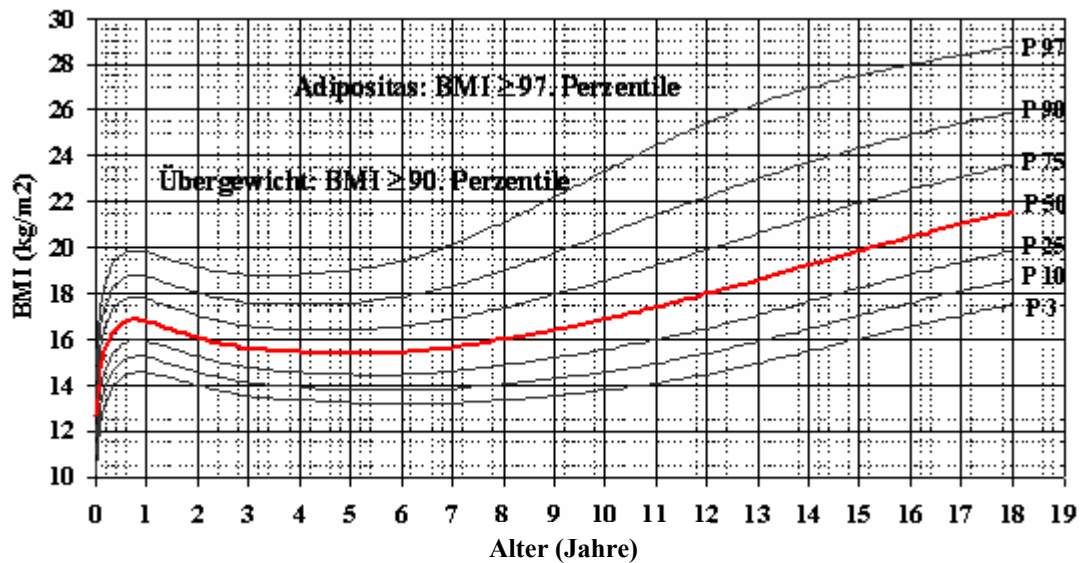


Abbildung 1-1: BMI-Perzentilenkurven für Mädchen im Alter bis 18 Jahren (modifiziert nach Kromeyer-Hauschild *et al.* 2001).

1.1.2 Prävalenz bei Kindern und Jugendlichen

Die Prävalenz der Adipositas ist in den vergangenen zwei Jahrzehnten weltweit stark angestiegen. Die WHO bezeichnet die Adipositas bei Kindern und Jugendlichen als eine „besorgniserregende Epidemie“ und verweist auf eine Schätzung, die bereits 1990 eine Zahl von 18 Millionen Kindern unter 5 Jahren als übergewichtig einstufte (WHO 2001). Die ersten Daten die von einem Anstieg der Adipositasprävalenz bei Kindern und Jugendlichen in Industrienationen berichten stammen aus den USA. Hier wurde in nationalen Gesundheits- und Ernährungsuntersuchungen zwischen Anfang der 80er und Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts eine Verdopplung der Prävalenz von Übergewicht bei Kindern dokumentiert (Troiano und Flegal 1998). Aktuelle Zahlen zeigen, dass diese Entwicklung in den USA weiterhin anhält (Jolliffe 2004).

Auch aus verschiedenen europäischen Ländern liegen Studien vor, die von einer Zunahme der Prävalenz von adipösen Kindern und Jugendlichen nach Beginn der 80er Jahre berichten (Fredriks *et al.* 2000; Hulens *et al.* 2001; Livingstone *et al.* 2001). Hinweise für eine Zunahme von Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland gibt es bislang nur aus wenigen regionalen Datenerhebungen. So zeigten Untersuchungen von Jenaer Schulkindern zwischen 1985 und 1995 (Kromeyer-Hauschild *et al.* 1999) sowie Daten des brandenburgischen Landesgesundheitsamtes für 6- und 16-jährige Kinder bzw. Jugendliche zwischen 1994 und 2000 (Böhm *et al.* 2002) einen deutlichen Anstieg der Adipositasprävalenz. Auch Daten von Schuleingangsuntersuchungen aus Nordrhein-

Westfalen (Landesinstitut für den öffentlichen Gesundheitsdienst, NRW 2003) und Untersuchungen des Leipziger *CrescNet* (Kiess *et al.* 2001; Keller *et al.* 2002) machen einen kontinuierlichen Prävalenzanstieg insbesondere im oberen Perzentilenbereich deutlich. Nach Auswertung der Kinder- und Jugend-Gesundheitsstudie des Robert-Koch-Institutes (KIGGS, URL <http://www.kiggs.de>) werden erstmals für ganz Deutschland repräsentative Daten vorliegen. Anhand der gegenwärtig vorhandenen Zahlen ist jedoch ersichtlich, dass in Deutschland die Zahl der Kinder und Jugendlichen mit Übergewicht und Adipositas deutlich und anhaltend zunimmt und diese Entwicklung in den nächsten Jahren vermutlich anhalten wird (Wabitsch 2004).

1.1.3 Ursachen für die Zunahme der Adipositasprävalenz

Der in den letzten Jahren zu verzeichnende rasche Anstieg der Adipositasprävalenz insbesondere bei Kindern und Jugendlichen wird maßgeblich auf einen veränderten Lebensstil mit körperlicher Inaktivität, veränderter Nahrungszusammensetzung und zunehmender Energiedichte der Nahrung zurückgeführt (Ebbeling *et al.* 2002). Unter diesen Umweltbedingungen haben genetische Faktoren vermutlich einen starken Einfluss auf die individuelle Anfälligkeit, Adipositas zu entwickeln (s. *Abbildung 1-2*). Eine solche genetische Prädisposition zu Adipositas erscheint aus evolutionsbiologischer Sicht plausibel: Erbanlagen, die mit einer vermehrten Nahrungsaufnahme oder einer verbesserten Energiespeicherung einhergehen, stellten in Zeiten limitierter Nahrungsressourcen einen Selektionsvorteil dar und wurden daher genetisch fixiert (*Thrifty Genotype Hypothesis*, Neel 1962). Erst zusammen mit den Ernährungs- und Bewegungsgewohnheiten der modernen Lebensweise konnte die weite Verbreitung dieser genetischen Ausstattung zu einer epidemischen Ausbreitung von Übergewicht und Adipositas führen (Hebebrand *et al.* 2000 und 2004).

Die Gene, die einer Veranlagung zu Adipositas zugrunde liegen, konnten bislang noch nicht eindeutig identifiziert werden. Auch wenn klinische Beobachtungen von Patienten bekannt sind, deren Adipositas auf Mutationen in einzelnen Genen beruht (Pérusse *et al.* 2005), erklären diese extrem seltenen monogenen Formen nicht die Pathogenese der quantitativ weitaus bedeutenderen „normalen“ Adipositas (Hinney *et al.* 1999 und 2003). Da die Erforschung der Körpergewichtsregulation in den letzten 10 Jahren außergewöhnliche Fortschritte erzielt hat, ist davon auszugehen, dass die Erkenntnisse zu den molekularen Ursachen der Adipositas in den nächsten Jahren rapide zunehmen werden (Hebebrand *et al.* 2004).

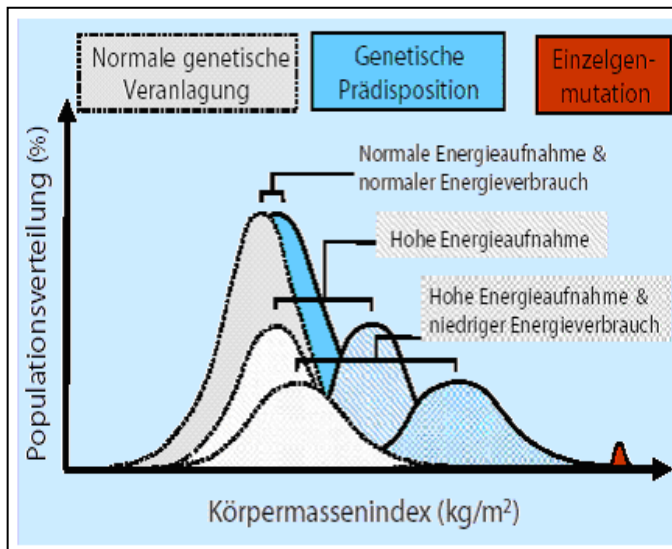


Abbildung 1-2: BMI-Verteilung in der Bevölkerung in Abhängigkeit von genetischer Prädisposition und Umwelteinflüssen. Sind Energieaufnahme und -verbrauch im Normbereich, wirkt sich eine genetische Prädisposition zu Adipositas kaum auf das Körpergewicht aus. Ist die Energieaufnahme aber hoch, zeigt sich bei genetisch prädisponierten Personen eine deutlichere Gewichtszunahme als bei solchen ohne entsprechende Veranlagung. Diese Unterschiede werden bei zusätzlich erniedrigtem Energieverbrauch noch deutlicher. Die seltenen Formen monogener Adipositas führen weitgehend unabhängig von Umweltfaktoren zu massiver Gewichtszunahme (aus Hofbauer 2002).

1.1.4 Medizinische Bedeutung

Auch wenn Adipositas früher hauptsächlich als kosmetisches Problem angesehen wurde, ist inzwischen weitgehend akzeptiert, dass es sich hierbei auch um ein erhebliches medizinisches Problem handelt. Diese Ansicht basiert auf großen epidemiologischen Studien, in denen sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko ergab (Kopelman 2000).

Das konkrete Gesundheitsproblem der Adipositas besteht in einer Erhöhung des Risikos für metabolische Veränderungen wie einer gestörten Glukosetoleranz bzw. Diabetes mellitus Typ 2, Dyslipoproteinämie und arterielle Hypertonie (Wabitsch 2000). Der Komplex aus Adipositas mit diesen pathogenetisch zusammenhängenden Symptomen wird auch als *metabolisches Syndrom* bezeichnet und stellt einen wesentlichen Risikofaktor für arteriosklerotische Gefäßveränderungen (Reaven 2003). Mit den steigenden Prävalenzzahlen für Adipositas findet man auch bei Kindern und Jugendlichen zunehmend Veränderungen, die dem metabolischen Syndrom entsprechen (Cruz und Goran 2004). In kürzlich durchgeführten Untersuchungen an adipösen deutschen Kindern und Jugendlichen konnte gezeigt werden, dass 36% mindestens einen und 3% alle Faktoren des metabolischen Syndroms aufwiesen (Mayer und Wabitsch 2003).

Auch wenn Adipositas selbst nicht als Krankheit gilt, kann sie als initialer Auslöser einer Vielfalt von chronischen Folgekrankheiten angesehen werden. Diese bedeuten nicht nur zusätzliche Belastungen für die Betroffenen sondern auch außerordentlich hohe Kosten für das Gesundheitswesen. Das macht deutlich, dass Prävention sowohl aus medizinischer als auch ethischer und gesundheitspolitischer Sicht angezeigt (Hebebrand *et al.* 2004).

1.2 Mechanismen der Körpergewichtsregulation

1.2.1 Anatomie der Gewichtsregulation

Um die Physiologie von Appetit, Hunger und Essverhalten zu verstehen ist es zunächst wichtig, den Elementen des Regelkreises biologische Strukturen zuzuordnen. Die entscheidenden Versuche zur Lokalisation appetitregulierender Regionen wurden bereits in den 1940er und 1950er Jahren durchgeführt. In diesen Experimenten wurden die Auswirkungen von Läsionen hypothalamischer Kerngebiete auf die Nahrungsaufnahme und Gewichtsentwicklung untersucht. Es zeigte sich, dass bilaterale Läsionen des lateralen hypothalamischen Areals (LHA) eine Aphagie bewirken (Anand und Brobeck 1951), während Läsionen im Bereich des ventromedialen Hypothalamus (VMH) zu einer Hyperphagie führen (Duggan und Booth 1986). Aufgrund dieser Befunde wurde dem LHA die Funktion des Appetitzentrums und dem VMH die Funktion des Sättigungszentrums zugeschrieben (Stellar 1954). In den nachfolgenden Jahren konnten noch weitere hypothalamische Regionen identifiziert werden, die Zentren in der Regulation von Energieaufnahme und Energieverbrauch darstellen. Der wichtigste unter ihnen ist der Nucleus arcuatus (ARC), ein kleiner Kern am Übergang des Infundibulums in den dritten Ventrikel. Der ARC hat zahlreiche neuronale Verbindungen zu anderen hypothalamischen Zentren wie dem Nucleus paraventricularis (PVN), dem VMH und dem LHA. Die Neuronen des ARC projizieren in kortikale und subkortikale Hirnareale sowie in Kerne des Hirnstamms, die für die Kontrolle des Essverhaltens verantwortlich sind (McMinn *et al.* 2000). Auch wenn die komplexen Interaktionen zwischen den unterschiedlichen Gehirnbereichen bis heute nicht vollständig verstanden sind wird klar, dass das einfache Bild vom Hunger- und Sättigungszentrum nicht mehr aufrechterhalten werden kann.

1.2.2 Zentraler Regelkreis der Gewichtsregulation

Das Körpergewicht des Menschen ist ein komplex reguliertes System, bei dem Energieaufnahme auf der einen Seite und Energieverbrauch in Form von Stoffwechselfunktionen, Thermogenese und motorischer Aktivität auf der anderen Seite miteinander in Wechselwirkung treten. Als Energiehomöostase bezeichnet man eine Balance zwischen beiden Prozessen, die eine präzise Einstellung des Körpergewichts auf einen individuellen Soll-Wert sicherstellt. Dieses Gleichgewicht wird durch einen neurohumoralen Regelkreis kontrolliert. Bei Abweichungen vom Soll-Wert setzen Kompensationsmechanismen ein, so dass auch bei Änderungen der Nahrungsaufnahme

oder des Energieverbrauches ein über lange Zeit weitgehend stabiles Körpergewicht gewährleistet ist. Zu den Bestandteilen dieses Regelkreises gehören hormonelle und nervale Signale aus der Körperperipherie, die in Abhängigkeit von der metabolischen Situation des Organismus den Ist-Zustand an hypothalamische Zentren übermitteln, sowie Neurotransmitter, die regulatorisch im zentralen Nervensystem (ZNS) wirken. Diese Neuropeptide werden vereinfacht in zwei Klassen eingeteilt: Anorexigene, die eine weitere Nahrungsaufnahme hemmen und Orexigene, die Appetit und die Nahrungsaufnahme stimulieren (Schwartz *et al.* 2000).

Eine zentrale Rolle in der Regulation des Körpergewichtes spielt das hypothalamische Melanocortinsystem. Die Peptide dieses Signalweges resultieren aus dem Vorläufermolekül Pro-Opiomelanocortin (POMC), das in den Neuronen des ARC gemeinsam mit dem *Cocaine- and Amphetamine-regulated Transcript* (CART) synthetisiert wird (Kristensen *et al.* 1998). Durch posttranslationale proteolytische Spaltungen entstehen aus POMC eine Reihe von Peptidhormonen. Eines dieser Peptide, das α -Melanozyten-stimulierende Hormon (α -MSH), erhielt seinen Namen, da es über den Melanocortin-1-Rezeptor (MC1-R) Melanozyten der Hautzellen aktiviert, welche für die Ausbildung der Fell- bzw. Haarfarbe verantwortlich sind (Cone *et al.* 1996). Erst später konnte man α -MSH auch im ZNS nachweisen, wo es an Melanocortin-4-Rezeptoren (MC4-R) hypothalamischer Neuronen bindet (Mountjoy *et al.* 1994). Die Axone der POMC/CART-Neuronen projizieren vom ARC zum PVN und in die perifornicale Region (PFA), wo sich eine hohe Dichte an MC4-Rezeptoren befindet. Durch die Bindung von α -MSH und Aktivierung des MC4-Rezeptors werden anorexigene Hormone wie das *Corticotropin-Releasing Hormone* (CRH), das *Thyreotropin-Releasing Hormone* (TRH) und Oxitocin in die Blutbahn abgegeben. Diese führen über eine Aktivierung kataboler Signalwege zur Reduzierung der Nahrungsaufnahme, Steigerung des Energieverbrauches und Stimulierung des sympathischen Nervensystems (s. *Abbildung 1-3*; Schwartz *et al.* 2000).

Ein wichtiger Gegenspieler der anorexigenen Peptide des Melanocortin-Signalweges ist das Neuropeptid Y (NPY). Dieses orexigene Effektorpeptid gilt als stärkster Stimulator der Nahrungsaufnahme (Stanley *et al.* 1986). NPY wird gemeinsam mit *Agouti-Related Peptide* (AgRP) in Neuronen des ARC exprimiert (Shutter *et al.* 1997). Von den NPY/AgRP-Neuronen verlaufen Axone zum LHA und zur PFA, wo das freigesetzte NPY an NPY-Rezeptoren bindet. Dort erfolgt die Freisetzung der orexigenen Neuropeptide *Melanin-Concentrating Hormone* (MCH) und Orexin 1 und 2, die über die Aktivierung

anaboler Signalwege zur Steigerung der Nahrungsaufnahme und Reduktion des Energieverbrauches führen (s. *Abbildung 1-3*; Schwartz *et al.* 2000). Der Neurotransmitter AgRP hat dagegen eine indirekt orexigene Wirkung. Als inverser Agonist bindet AgRP an den MC4-Rezeptor und hemmt dadurch die anorexigene Wirkung von α -MSH (Ollmann *et al.* 1997).

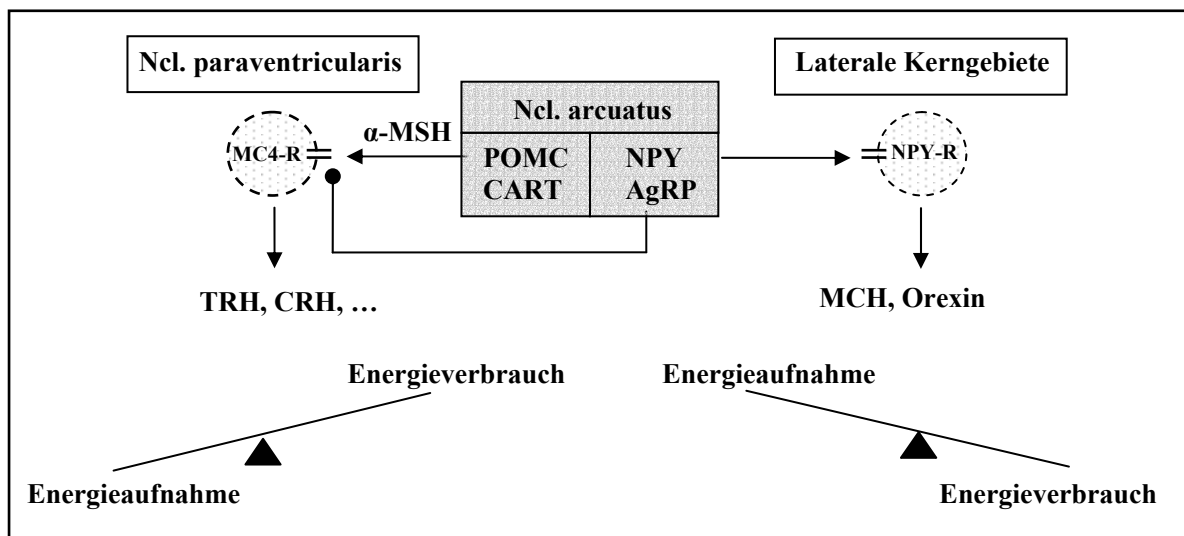


Abbildung 1-3: Kontrolle der Energiehomöostase durch Neuronen des Hypothalamus. Im arkuaten Kerngebiet des Hypothalamus existieren zwei Neuronengruppen, POMC/CART- und NPY/AgRP-Neuronen, die durch Hormone aus der Peripherie reguliert werden. AgRP und NPY sind orexigene Neuropeptide, welche die Nahrungsaufnahme stimulieren und den Energieverbrauch senken, während die anorexigenen Neuropeptide α -MSH und CART die Nahrungsaufnahme inhibieren und den Energieverbrauch steigern.

1.2.3 Periphere Regulation der Nahrungsaufnahme

Um metabolische Informationen aus der Peripherie an das zentrale Netzwerk zu übermitteln, zirkulieren Mediatoren insbesondere aus dem Fettgewebe und dem oberen Gastrointestinaltrakt im Blut und geben Signale an hypothalamische Rezeptoren weiter. Hierbei unterscheidet man langfristige Signale, die Informationen über die Energiespeicher an das ZNS weiterleiten und kurzfristige Signale, die während einer Nahrungsaufnahme dem ZNS Rückmeldung über die Energieaufnahme geben (Bray 2000). Diese Informationen werden integriert und modifizieren die Expression orexigener und anorexigener Neurotransmitter (s. *Abbildung 1-4*).

Langfristige Regulation der Energiehomöostase

Bereits 1953 stellte Kennedy die Hypothese auf, dass von den Körperfettspeichern inhibitorische Signale an das ZNS weitergeleitet werden, die in Abhängigkeit von der metabolischen Situation des Organismus die Nahrungsaufnahme regulieren (Kennedy 1953). Der Nachweis dieser Signale gelang in Parabiose-Versuchen an genetisch adipösen

Mäusen, den so genannten *obese* Mäusen. Wenn der Blutkreislauf dieser Mäuse mit dem gesunder Kontrolltiere verbunden wurde, kam es zu einer drastischen Gewichtsabnahme der adipösen Tiere, woraus die Existenz eines zirkulierenden Sättigungssignals postuliert wurde (Coleman 1973). Die Identität dieses hypothetischen „Schlankheitsfaktors“ konnte erst viele Jahre später mit der Klonierung des defekten Gens der *obese* Maus aufgeklärt werden (Zhang *et al.* 1994). Das Gen kodiert für ein Peptidhormon, das bei intraperitonealer Gabe zur Normalisierung des Körpergewichts der *obese* Maus führt (Halaas *et al.* 1995). Aufgrund dieser anorexigenen Wirkung wurde das Protein in Anlehnung an das altgriechische *leptos* für schlank, Leptin genannt.

Die Entdeckung von Leptin hat wesentlich zum molekularen Verständnis der Körpergewichtsregulation beigetragen. Schon bald konnte durch weitere Experimente ein einfacher Regelkreis aufgestellt werden: Leptin wird von Adipozyten proportional zur Körperfettmasse synthetisiert und in die Blutzirkulation freigesetzt (Maffei *et al.* 1995; Considine *et al.* 1996). Leptin bindet an spezifische Rezeptoren im ARC und anderen hypothalamischen Arealen, in denen Hunger und Sättigung kontrolliert werden. Dort kommt es in zwei verschiedenen Neuronengruppen zu einer gegensinnigen Änderung der Genexpression: in der einen Neuronengruppe wird die Expression von POMC und CART gesteigert, während die NPY- und AgRP-Genexpression in einer zweiten Neuronengruppe reduziert wird (Barsh und Schwartz 2002). Die gesteigerte Synthese der anorexigenen Neurotransmitter α -MSH und CART bei gleichzeitig verminderter Bildung von orexigenem NPY und AgRP stellt eine reziproke, aber in der Summe physiologisch gleichsinnige Antwort auf steigende Leptinspiegel dar. Die Folge ist eine reduzierte Nahrungsaufnahme, die bei anhaltendem Signal zu einer verminderten Körperfettmasse führt und dadurch wiederum die Leptin-Produktion bestimmt. Somit entsteht ein einfacher Regelkreis, wie er in der Endokrinologie häufig zu finden ist.

Leptin ist nicht das einzige Hormon, welches als peripheres Signal das Gehirn über den Ernährungszustand des Körpers informiert und dadurch die Energiehomöostase reguliert. So ist seit langem bekannt, dass die Applikation von Insulin in das ZNS von Nagetieren zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme und dadurch zu einer Gewichtsabnahme führt (Brüning *et al.* 2000). In einer Reihe von experimentellen Untersuchungen konnte für Insulin ein leptinähnlicher, wenn auch schwächerer anorexigener Effekt beobachtet werden. Insulin wird von der Bauchspeicheldrüse abhängig vom Blutzuckerspiegel ausgeschüttet und gelangt über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS. Dort führt es in den Neuronen des ARC zu den gleichen Änderungen der reziproken Genexpression wie Leptin

(Schwartz *et al.* 1992). Die Insulin- und Leptin- Zielneuronen des ARC aktivieren nach Bindung der jeweiligen Rezeptoren einen gemeinsamen intrazellulären Signaltransduktionsweg (s. *Kapitel 1.5.3*; Brüning *et al.* 2000). Da Insulin im Vergleich zu dem relativ konstanten Serumspiegel von Leptin stark mahlzeitabhängige Schwankungen aufweist, vermutet man in diesen beiden anorexigenen Hormonen langfristig-tonische bzw. kurzfristige Mahlzeit-adaptierende Komponenten der Gewichtsregulation.

Kurzfristige Regulation von Hunger und Sättigung

Gibbs und Smith stellten 1986 die Theorie auf, dass während der Nahrungsaufnahme so genannte Sättigungsfaktoren gebildet werden, welche kurzfristig inhibitorisch auf eine weitere Nahrungsaufnahme wirken (Gibbs und Smith 1986). Schon seit geraumer Zeit werden gastrointestinale Peptide auf ihre potentielle Wirkung als Sättigungsfaktoren untersucht. Eines der ersten Peptide, für das eine solche Hemmung der Nahrungsaufnahme nachgewiesen werden konnte, ist Cholezystokinin (CCK, Gibbs *et al.* 1973). CCK wird im Duodenum bei Anwesenheit unverdauter Nahrung und durch infolge der Magendehnung stimulierte Vagusfasern im LHA ausgeschüttet und übermittelt über CCK-2 Rezeptoren im Hypothalamus Sättigungssignale (Smith *et al.* 1981). Mittlerweile gibt es für zahlreiche weitere Peptidhormone des Gastrointestinaltraktes Befunde, die auf eine Modulation der Nahrungsaufnahme hindeuten (Schwartz *et al.* 2000). Eine neuere Entdeckung ist Ghrelin, ein Proteohormon, das von Funduszellen des Magens synthetisiert wird (Tschöp *et al.* 2000). Der Serumspiegel von Ghrelin folgt einer Tagesrhythmik, die sich dem Verlauf täglicher Mahlzeiten anpasst. So erreicht Ghrelin kurz vor einer Mahlzeit hohe Serumspiegel, um schon im Verlauf der Nahrungsaufnahme abzufallen und dann langsam wieder bis zur nächsten Mahlzeit anzusteigen (Cummings *et al.* 2001). Es konnte gezeigt werden, dass dieses körpereigene „Hungersignal“ über Ausmaß der Nahrungsaufnahme sowie die Größe und Häufigkeit der Mahlzeiten entscheidet. Ghrelin aktiviert NPY-Neuronen des ARC und initiiert so die Freisetzung des orexigenen NPY im PVN (Cowley *et al.* 2003). Die periphere Gabe von Ghrelin bewirkt bei Nagetieren eine deutliche Gewichtszunahme sowie beim Menschen erhöhte Nahrungsaufnahme (Tschöp *et al.* 2000). Ghrelin stellt somit einen orexigenen Gegenspieler zum anorexigenen Leptin/Insulin-Paar dar. Möglicherweise besteht analog zum ZNS auch in der Peripherie ein reziprokes Regulationsprinzip. Demnach könnte ein erhöhter Ghrelin-Spiegel bei gleichzeitig fallendem Leptinspiegel ein Signal bei der Entstehung von Hunger und damit der Motivation zur Nahrungsaufnahme darstellen.

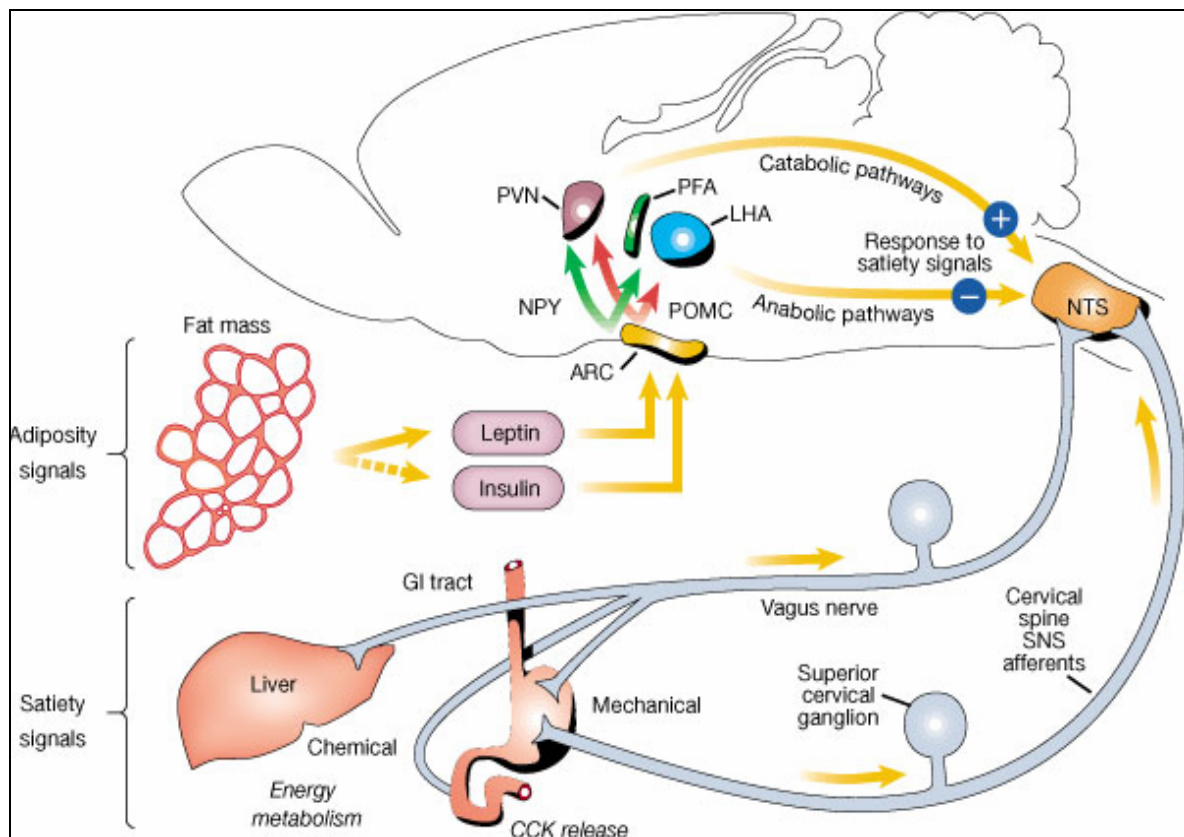


Abbildung 1-4: Regulation der Nahrungsaufnahme durch periphere Signale. Leptin und Insulin stellen Adipositasignale (*adiposity signals*) dar und stimulieren über POMC/CART-Neuronen katabolische bzw. inhibieren über NPY/AgRP-Neuronen anabolische Signalwege. Die Neuronengruppen des Nucleus arcuatus (ARC) projizieren in übergeordnete Zentren (PVN: paraventriculärer Nukleus, LHA: lateraler Hypothalamus, PFA: perifornicale Region) und leiten die Signale an autonome Zentren im Hirnstamm weiter. Afferente Sättigungssignale (*satiety signals*) aus der Leber und dem Verdauungstrakt gelangen über den Nervus vagus und sympathische Nervenbahnen zum Nucleus tractus solitarii (NTS) und werden dort mit hypothalamischen Efferenzen integriert (aus Schwartz *et al.* 2000).

1.3 Genetische Determination des Körpergewichts

1.3.1 Formalgenetische Befunde

In zahlreichen Zwillings-, Adoptions- und Familienstudien der vergangenen Jahrzehnte konnte eine genetische Determination des Körpergewichts belegt werden. Allerdings kommen die verschiedenen Ansätze zu teilweise deutlich unterschiedlichen Schätzungen bezüglich der Heritabilität, d.h. der Erklärung des genetisch bedingten Anteils der phänotypischen Varianz (Hebebrand *et al.* 1998; Maes *et al.* 1997). Am höchsten wird diese in Zwillingsuntersuchungen eingestuft. Stunkard und Mitarbeiter (1990) untersuchten getrennt und gemeinsam aufgewachsene monozygote Zwillinge. Um den genetischen Einfluss auf das Körpergewicht abschätzen zu können, wurden Intrapaaarkorrelationen herangezogen. Die Untersuchung ergab, dass sich die gemeinsam aufgewachsenen

Zwillinge bezüglich des BMI nicht stärker ähnelten als die getrennt aufgewachsenen. Die Erblichkeitsschätzungen für den BMI betrugen über das gesamte Gewichtsspektrum etwa 70%. Umweltfaktoren, welche die restlichen 30% der Varianz des BMI erklärten, waren für die jeweiligen Zwillinge spezifisch (*non-shared environment*). Demnach haben gemeinsam gemachte Umwelterfahrungen (*shared environment*) keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf das Körpergewicht (Stunkard *et al.* 1990). Ein geringer Einfluss gemeinsamer Umwelterfahrungen konnten auch in einer groß angelegten Adoptionsstudie bestätigt werden. Hier fand sich kein Zusammenhang zwischen dem BMI der Adoptivlinge und der Adoptiveltern. Dagegen ergaben die Untersuchungen eine enge Beziehung zwischen der Gewichtsklasse der Adoptivlinge und dem BMI der biologischen Eltern (Stunkard *et al.* 1986).

Neben Zwillings- und Adoptionsstudien bilden Familienstudien den dritten Pfeiler der Formalgenetik. Hier liegen Eltern-Kind Korrelationen für den BMI je nach Studie zwischen 0,1 und 0,3 (Hebebrand *et al.* 2001). In einer Familienstudie fand sich ein starker autosomal-rezessiver Hauptgeneffekt, der für fast 35% der Varianz des BMI verantwortlich gemacht wurde. Weitere 42% der phänotypischen Varianz erklärten sich durch polygene Effekte, der verbleibende Anteil von 23% wurde auf Umweltfaktoren zurückgeführt (Moll *et al.* 1991). Die Ursachen für die unterschiedlichen Heritabilitätsschätzungen sind zwar nicht genau bekannt, aber mutmaßlich auf die komplexen Berechnungsansätze und Modellannahmen zurückführbar (Hebebrand *et al.* 2004). Zusammenfassend zeigen die formalgenetischen Befunde, dass das Körpergewicht als multifaktorieller Phänotyp aufgefasst werden kann, der durch das Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen determiniert wird (s. *Kapitel 1.4.1*).

1.3.2 Molekulargenetische Befunde im Tiermodell

Bei Nagetieren konnten bislang 9 monogene Formen der Adipositas identifiziert werden. In diesen Tiermodellen werden Mutationen in jeweils nur einem Gen als Ursache für den adipösen Phänotyp angesehen. Auch wenn die einzelnen Genveränderungen nur bei einem vergleichsweise sehr geringen Teil der Tiere den Phänotyp erklären, hat die Klonierung und Charakterisierung der verantwortlichen Gene in den letzten Jahren wesentlich zum Verständnis der Körpergewichtsregulation beigetragen.

Die zwei bekanntesten Mutationen betreffen das Leptin- (Zhang *et al.* 1994) und das Leptinrezeptor-Gen (Tartaglia *et al.* 1995; Chen *et al.* 1996). Die jeweiligen Mausmodelle

zeigen einen Phänotyp, der durch früh einsetzende Adipositas, Hyperphagie sowie neuroendokrinologische Auffälligkeiten gekennzeichnet ist. Jedoch haben die Genmutationen der *obese* Maus die Bildung eines funktionsuntüchtigen Leptins zur Folge, während bei der *diabetes* Maus ein defekter Leptin-Rezeptor vorliegt. Daher lassen sich bei *obese* Mäusen die beobachteten Symptome durch zentralnervöse Leptingabe wieder aufheben, während dies bei *diabetes* Mäusen nicht möglich ist (Mizuno *et al.* 1998; Shutter *et al.* 1997).

Neben *obese* und *diabetes* sind noch 6 weitere autosomal-rezessiv sowie eine autosomal-dominant vererbte Form der Adipositas bei Mäusen bekannt (s. *Tabelle 1-2*; Pérusse *et al.* 2005). So konnte bei *fat* Mäusen eine Mutation identifiziert werden, die zu einem Funktionsverlust der Carboxypeptidase E (CPE) führten und dadurch die Aktivierung von Pro-Hormonen wie POMC verhinderten (Naggert *et al.* 1995). Die *Agouti yellow* Maus weist eine autosomal-dominante Mutation im *Agouti* Gen auf, welches physiologisch an der Regulation der Pigmentierung über MC1-Rezeptoren beteiligt ist (Bultmann *et al.* 1992). Die Mutation hat nicht nur eine Überexpression zur Folge, sondern führt zusätzlich zu einer ektopen Expression des Agouti Proteins in verschiedenen Organsystemen wie auch im ZNS, wo es wie das dort physiologisch vorkommende AgRP antagonistisch auf zentrale MC4-Rezeptoren wirkt (Ollmann *et al.* 1997).

Tabelle 1-2: Monogene Formen der Adipositas im Mausmodell (aus Pérusse *et al.* 2005).

Mausmodell	Gen	Genprodukt	Erbgang	Referenzen
<i>diabetes (db)</i>	<i>Lepr</i>	Leptin-Rezeptor	autosomal rezessiv	Chen <i>et al.</i> 1996 Tartaglia <i>et al.</i> 1995
<i>fatty liver dystrophy (fld)</i>	<i>Lipin1</i>	Lipin	autosomal rezessiv	Peterfy <i>et al.</i> 2001
<i>fat (fat)</i>	<i>Cpe</i>	Carboxypeptidase E	autosomal rezessiv	Naggert <i>et al.</i> 1995
<i>OETF</i>	<i>Cckar</i>	Cholezystokinin-Rezeptor 1	autosomal rezessiv	Funakoshi <i>et al.</i> 1995
<i>little</i>	<i>GH</i>	Wachstumshormon	autosomal rezessiv	Donahue und Beamer 1993
<i>obese (ob)</i>	<i>Lep</i>	Leptin	autosomal rezessiv	Zhang <i>et al.</i> 1994
<i>tubby (tub)</i>	<i>Tub</i>	Insulin Signalprotein	autosomal rezessiv	Noben-Trauth <i>et al.</i> 1996 Kappeler <i>et al.</i> 1999
<i>mahogany (mg)</i>	<i>ATRn</i>	Attraktin	autosomal rezessiv	Nagle <i>et al.</i> 1999 Gunn <i>et al.</i> 1999
<i>agouti yellow (A^y)</i>	<i>A^y</i>	Agouti Signalprotein	autosomal dominant	Bultmann <i>et al.</i> 1992 Wilson <i>et al.</i> 1995

Die technischen Fortschritte der letzten Jahre ermöglichten die gezielte Ausschaltung (*knock-out*) oder Überexpression (*knock-in*) bekannter zentral oder peripher exprimierter Kandidatengene in einzelnen Zellen oder bestimmten Geweben. Durch diese Technik konnten bisher zahlreiche transgene Mausmodelle für den Phänotyp Adipositas generiert werden (Tschöp und Heiman 2001). Die Beobachtung der physiologischen Auswirkungen liefern wichtige Hypothesen zur Funktion der betreffenden Gene bei der Gewichtsregulation. Die populärsten adipösen Mausmodelle sind MC4-Rezeptor- und POMC- *knock-out* Mäuse, die sich durch eine früh einsetzende extreme Adipositas auszeichnen (Huszar *et al.* 1997; Yaswen *et al.* 1999). In anderen Fällen kann der erwartete adipöse Phänotyp jedoch nicht beobachtet werden. So führt die gezielte Ausschaltung von NPY bei Mäusen zu keiner Änderung von Körpergewicht und Nahrungsaufnahme (Erickson *et al.* 1996). Neuere Studien berichten von kombinierten NPY/AgRP- *knock-out* Mäusen, die ebenfalls keine erkennbaren Veränderungen in Nahrungsaufnahme und Körpergewicht zeigen (Qian *et al.* 2002). Auch wenn sich die beschriebenen hypothalamischen Regelkreise (s. Kapitel 1.2.2) zunächst trivial darstellen, zeigen diese Beobachtungen, dass sich dahinter offenbar ein komplexes Geschehen verbirgt, welches bislang nur unvollständig verstanden ist.

1.3.3 Molekulargenetische Befunde beim Menschen

Die tierexperimentellen Befunde haben der molekulargenetischen Erforschung der Adipositas erheblichen Aufwind gegeben und zur Aufklärung homologer Genveränderungen beim Menschen geführt. So konnten schon bald nach der Entdeckung des *obese* Gens bei der Maus im Jahr 1997 auch beim Menschen Mutationen in diesem Gen identifiziert werden (Montague *et al.* 1997). Homozygote Mutationsträger entwickeln infolge der Leptindefizienz eine hochgradige, frühmanifeste Adipositas. Die Betroffenen zeigen zusätzlich einen hypothalamischen Hypogonadismus mit Ausbleiben der sexuellen Reifung (Strobel *et al.* 1998). Mutationen im *obese* Gen sind bislang weltweit bei lediglich einzelnen extrem adipösen Personen aus Familien pakistanischer und türkischer Herkunft diagnostiziert worden (Ahima und Flier 2000). Ein Jahr nach der Entdeckung der Mutationen im Leptin-Gen beschrieben Clement und Mitarbeiter einen Defekt im humanen Leptin-Rezeptor, der zu massiver frühkindlicher Adipositas und hypophysärer Dysfunktion führt (Clement *et al.* 1998). Im Gegensatz zur Leptindefizienz kann bei dieser Form der Adipositas durch eine Behandlung mit rekombinantem Leptin keine Gewichtsreduktion und Normalisierung des Essverhaltens erzielt werden (Farooqi *et al.* 1999).

Bis heute konnten beim Menschen in 9 verschiedenen Genen autosomal-rezessiv vererbte Veränderungen aufgeklärt werden, die für Adipositas verantwortlich sind. Die bekanntesten sind in *Tabelle 1-3* aufgeführt (Pérusse *et al.* 2005). Diese rezessiven Formen monogener Adipositas sind extrem selten und mit weiteren, meist endokrinologischen Auffälligkeiten assoziiert. Daher können diese Befunde nicht die Entstehung der allgemeinen Adipositas erklären (Hinney *et al.* 1999). Die gegen Ende des letzten Jahrhunderts erstmalig entdeckten Mutationen im Gen für den Melanocortin-4-Rezeptor (*MC4-R*) sind dagegen aufgrund ihrer Häufigkeit klinisch relevant. Basierend auf der Beobachtung, dass *Mc4-r knock-out* Mäuse adipös sind, wurden beim Menschen systematische Mutationsanalysen des *MC4-R* Gens bei extrem übergewichtigen Menschen vorgenommen. Bislang sind weltweit mehr als 70 verschiedene Mutationen beschrieben, die zu einer eingeschränkten oder vollständig gestörten Rezeptorfunktion führen (Vaisse *et al.* 2000; Yeo *et al.* 2003; Hinney *et al.* 1999; Farooqi *et al.* 2000). Diese funktionell relevanten *MC4-R* Mutationen segregieren in Familien mit autosomal-dominanter Vererbung und variabler Penetranz. Typischerweise sind die Betroffenen schon in der Kindheit adipös und zeigen im Vergleich zu den vorgenannten rezessiven monogenen Formen der Adipositas keine weiteren phänotypischen und endokrinologischen Auffälligkeiten (Farooqi *et al.* 2003; Sina *et al.* 1999). Schätzungsweise 1 bis 4% der extrem adipösen Kinder und Erwachsenen weisen relevante Mutationen im *MC4-R* Gen auf. Damit stellt ein defekter MC4-Rezeptor die häufigste bekannte Form der monogenen Adipositas dar (Hinney *et al.* 2006). In den nächsten Jahren ist mit der Entdeckung weiterer Genvarianten zu rechnen, die zur Entstehung von Adipositas beitragen, als auch wie unlängst gezeigt werden konnte- eine protektive Wirkung haben können (Geller *et al.* 2004; Heid *et al.* 2005).

Tabelle 1-3: Auswahl monogener Formen der Adipositas beim Menschen (aus Pérusse *et al.* 2005).

Gen	chromos. Lokalisation	Referenz
<i>Leptin-Rezeptor (LEPR)</i>	1p31	Clement <i>et al.</i> 1998
<i>Pro-Opiomelanocortin (POMC)</i>	2p23.3	Challis <i>et al.</i> 2002 ; Krude <i>et al.</i> 1998
<i>Prohormonkonvertase-1 (PCSK1)</i>	5q15-q21	Jackson <i>et al.</i> 1997 und 2003
<i>Single-minded Homolog 1 (SIM 1)</i>	6q16.3-q21	Faivre <i>et al.</i> 2002 ; Holder <i>et al.</i> 2000
<i>Leptin (LEP)</i>	7q31.3	Montague <i>et al.</i> 1997 ; Strobel <i>et al.</i> 1998
<i>Melanocortin-4 Rezeptor (MC4-R)</i>	18q22	Farooqi <i>et al.</i> 2000 ; Hinney <i>et al.</i> 1999; Vaisse <i>et al.</i> 1998; Yeo <i>et al.</i> 1998

Neben den genannten monogenen Ursachen können in seltenen Fällen auch genetische Syndrome Ursache meist therapieresistenter Adipositas sein. In der klinischen Genetik sind mehr als 75 unterschiedliche Syndrome bekannt, die obligat oder fakultativ mit Adipositas assoziiert sein können (Pérusse *et al.* 2005). Hierbei stellt die Adipositas praktisch nie ein isoliertes Symptom dar, sondern wird ergänzt durch weitere Merkmale wie mentale Entwicklungsstörungen, Kleinwuchs und Hypogonadismus. Das bekannteste Beispiel für eine syndromale Form der Adipositas ist das Prader-Willi-Syndrom. Die betroffenen Patienten entwickeln schon in der frühen Kindheit durch unkontrollierte Nahrungsaufnahme eine massive Adipositas. Gleichzeitig besteht häufig eine motorische Entwicklungsstörung, verminderte Intelligenz sowie ein hypogonadotroper Hypogonadismus. Andere Beispiele für syndromale Adipositas sind das Bardet-Biedl-, Cohen- und Alström-Syndrom. Die Charakterisierung der für das Symptom Adipositas verantwortlichen Gene bei den syndromalen Formen könnte für die Aufklärung der molekularen Mechanismen der allgemeinen Adipositas bedeutsam sein (Hebebrand und Renschmidt 1995).

1.4 Ansätze zur Identifizierung Adipositas-relevanter Gene

1.4.1 Adipositas als komplexer Phänotyp

Mit Ausnahme der seltenen monogenen Formen (s. *Kapitel 1.3.3*) gilt Adipositas als klassisches Beispiel für einen quantitativen oder komplexen Phänotypen (Barsh *et al.* 2000). Im Gegensatz zu einfach mendelnden Erbkrankheiten, die durch einen Defekt in einem spezifischen Gen verursacht werden, zeichnen sich genetisch komplexe Erkrankungen durch ein kompliziertes Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen aus (Lander und Schork 1994). Die genaue Zahl der beteiligten Faktoren sowie die Art der Gen-Umwelt Interaktionen sind weitgehend unbekannt. Nach heutiger Vorstellung liegt die genetische Grundlage komplexer Erkrankungen in mehreren (*oligogenes*) bis hin zu vielen (*polygenes*) Genvarianten mit jeweils unterschiedlichem Einfluss auf den Phänotyp begründet. Demnach ist ein Zusammenspiel vieler Genvarianten mit jeweils sehr kleinem Effekt (*minor gene effect*) oder weniger Varianten mit starkem Einfluss auf die Merkmalsausprägung (*major gene effect*) denkbar. Der „*common gene, common variant*“-Hypothese zufolge liegt die genetische Grundlage weit verbreiteter komplexer Erkrankungen in ebenfalls weit verbreiteten Allelen begründet (Lander 1996). So konnte eine Metaanalyse in verschiedenen Populationen eine Assoziation eines

frequenten Polymorphismus im β_3 -Adrenorezeptor-Gen mit dem BMI und Diabetes mellitus Typ 2 bestätigen (Fujisawa *et al.* 1998). Eine andere Hypothese nimmt an, dass eher seltene Varianten für die Entstehung komplexer Erkrankungen verantwortlich sind (Lohmueller *et al.* 2003; Pritchard *et al.* 2001). Ein Beispiel hierfür sind die seltenen Mutationen im MC4-Rezeptorgen, die an der Entstehung von Adipositas beteiligt sind (s. Kapitel 1.3.3; Geller *et al.* 2004; Heid *et al.* 2005).

Die chromosomalen Regionen der Gene, die einen Einfluss auf die Merkmalsausprägung komplexer Phänotypen haben, werden als *Quantitative Trait Loci* (QTLs) bezeichnet (Doerge 2002). Die Identifizierung und Kartierung von QTLs steht im Vordergrund der modernen Adipositas-Forschung. Die beiden grundlegenden Strategien, die hierbei zur Anwendung kommen werden nachfolgend erläutert.

1.4.2 Kopplungsuntersuchungen

Eine Möglichkeit zur Aufklärung der molekularen Ursache einer Erkrankung ist die Ermittlung der chromosomalen Lokalisation und anschließende Isolierung des verantwortlichen Gens. Zur Kartierung des entsprechenden Genortes wird eine Kopplungsanalyse in Familien mit einem oder mehreren betroffenen Personen durchgeführt. Hierbei werden Stammbäume daraufhin untersucht, ob der entsprechende Phänotyp gehäuft mit einem spezifischen polymorphen Markerallel vererbt wird.

Das Prinzip der Kopplungsanalyse beruht darauf, dass zwei Genorte umso seltener durch meiotische Rekombination getrennt werden, je näher sie beieinander liegen. Die gemeinsame Segregation einer spezifischen Variante des Markers mit dem Phänotyp wird statistisch berechnet und anhand der *LOD (logarithm of the odds) -score* Funktion angegeben. Ein Hinweis auf Kopplung zweier Genorte liegt vor, wenn der maximale *LOD-score* eine definierte Grenze überschreitet. Die chromosomale Region, die einen Marker mit signifikant hohem *LOD-score* umgibt, wird als Kandidatenregion bezeichnet. Um das tatsächliche Kandidatengen innerhalb dieses chromosomalen Abschnitts zu identifizieren, kommen zwei wesentliche Strategien zum Einsatz. Wird das relevante Gen ausschließlich aufgrund seiner chromosomalen Lokalisation durch Sequenzierung oder Auswertung von Sequenzinformationen identifiziert, spricht man von Positionsklonierung. Bei der zweiten Strategie werden in der relevanten chromosomalen Region plausible Kandidatengene (s. Kapitel 1.4.3), so genannte Positionskandidaten identifiziert und analysiert.

Da klassische Kopplungsuntersuchungen parametrisch sind, d.h. Vorstellungen über Vererbungsmodus, Allelfrequenzen und Penetranz voraussetzen, spielt diese Strategie bei der Erforschung komplexer Krankheiten wie Adipositas eine untergeordnete Rolle. Hier kommen spezielle Varianten klassischer Kopplungsuntersuchungen, die familienbasierten Kopplungsuntersuchungen oder *Genom-scans*, zum Einsatz. Diese Ansätze ermöglichen hypothesenunabhängig und genomweit nach phänotyprelevanten chromosomalen Regionen zu suchen. Hierzu werden polymorphe DNA-Marker, die gleichmäßig über das Genom verteilt sind, in allen Generationen auf gemeinsame Segregation mit dem Phänotyp untersucht. Für solche Untersuchungen werden häufig Geschwisterpaar- (*sib pair*-) Ansätze verwendet, bei denen neben dem Indexprobanden mindestens eines seiner Geschwister und beide Eltern einbezogen werden (Hebebrand *et al.* 2001). Anhand der Überlegung, dass sich phänotypisch ähnliche Geschwister auch genotypisch ähneln sollten, sucht man nach Regionen, die bei beiden Geschwistern häufiger auftreten als aufgrund zufälliger Vererbung zu erwarten wäre (Ziegler 1999). Dazu werden mehrere DNA-Marker bei Geschwisterpaaren und deren Eltern untersucht und die Übereinstimmung der Allele ermittelt (*allele sharing*). Befindet sich ein DNA-Marker in der Nähe eines für den Phänotyp relevanten Gens, erwartet man bei betroffenen Geschwistern ein überzufällig häufiges Auftreten des Markerallels.

1.4.3 Kandidatengenansatz

Wegen der enormen Größe einer Kandidatenregion, der zum Teil schlechten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und der Möglichkeit falsch-positiver bzw. falsch-negativer Ergebnisse hat sich die hypothesenfreie Suche nach Suszeptibilitätsgenen in Kopplungsregionen als sehr schwierig erwiesen. Eine alternative Methode ist die direkte Analyse von funktionellen Kandidatengenen. Hierbei wird gezielt nach Genen gesucht, deren von der Norm abweichende Funktion zur Entstehung des Phänotyps beitragen könnte. Kandidatengene zum Phänotyp Adipositas können beispielsweise einen nachgewiesenen oder mutmaßlichen Einfluss auf Nahrungsaufnahme, Energiezufuhr oder Energieverbrauch haben. Naturgemäß erfordert dieser Ansatz, dass man über eine pathophysiologische Hypothese hinsichtlich der Entstehung des Phänotyps verfügt.

Nachdem ein plausibles Kandidatengen ausgewählt wurde, wird dieses mit Hilfe molekulargenetischer Methoden systematisch nach Sequenzvarianten untersucht. Die häufigste Form genetischer Varianten stellen die *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) dar. Diese Polymorphismen bestehen nur aus einem veränderten Nukleotid und kommen

definitionsgemäß mit einer Häufigkeit von mindestens 1% in der Bevölkerung vor. SNPs machen etwa 0,1% des menschlichen Genoms, also circa 3 Millionen Basenpaare, aus. Es wird geschätzt, dass es in der Weltbevölkerung mindestens 10 bis 15 Millionen unterschiedliche SNPs gibt. Die meisten davon bleiben für den Menschen folgenlos, während ein Teil dieser Sequenzvarianten für eine individuelle Krankheitsdisposition verantwortlich sein könnte. Beispielsweise führen funktionelle SNPs zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz oder der transkriptionellen Aktivität und beeinflussen dadurch die Menge des gebildeten Proteins. Aber auch stumme oder intronische SNPs, die lange Zeit als ineffektiv betrachtet wurden, können Einfluss auf die Transkription und Spleißprozesse haben (Brookes 1999).

Die in Kandidatengenomen identifizierten SNPs werden üblicherweise in Fall-Kontroll-Studien analysiert (s. *Kapitel 2.9.1*). Hierbei werden die Allelverteilungen der in einer Fall- und Kontrollgruppe genotypisierten Varianten miteinander verglichen. Ergeben sich signifikante Unterschiede im Hinblick auf die Frequenz, spricht man von einer Assoziation. Ursache hierfür kann eine funktionelle Variante, die einen direkten Einfluss auf den Phänotyp hat, sein (Böddker und Ziegler 2000). Jedoch ist ein positiver Befund im Assoziationstest *a priori* noch kein Hinweis auf eine kausale Beziehung der untersuchten Variante mit dem Phänotyp. So kann eine Assoziation auch zustande kommen, wenn die krankheitsverursachende Mutation erstmalig auf einem Haplotyp mit dem Markerallel entstanden ist. Ist in diesem Fall der chromosomale Abstand sehr gering, segregiert das krankheitsverursachende Allel auf Populationsebene über viele Generationen gemeinsam mit dem Markerallel und führt zu einem so genannten Kopplungsungleichgewicht (*Linkage Disequilibrium*, LD). Daher sind funktionelle *in vitro* bzw. *in vivo* Untersuchungen erforderlich, um den Einfluss einer Mutation auf die Ausprägung des Phänotyps definitiv klären zu können.

1.5 Kandidatengene des Leptin-Signalweges

1.5.1 Leptinresistenz und Adipositas

Schon bald nach der ersten Beschreibung eines genetisch bedingten Leptinmangels als Ursache der Adipositas bei *obese* Mäusen (Zhang *et al.* 1994) wurden entsprechende Mutationen im humanen Leptin-Gen beschrieben (s. *Kapitel 1.3.3*). Bei diesen seltenen Fällen erblichem Leptinmangels handelt es sich um Patienten, die schon im Kindesalter an

unstillbarem Hunger und ausgeprägter Adipositas leiden (Montague *et al.* 1997; Farooqi *et al.* 2002). Wie bei leptindefizienten Mäusen können auch bei diesen Patienten die Symptome durch exogene Zufuhr von Leptin entscheidend gebessert werden (Farooqi *et al.* 1999 und 2002). Dementsprechend hoch waren die Erwartungen, die sich an Leptingabe als Therapie der Adipositas knüpften. Die Ergebnisse der ersten klinischen Studie mit rekombinantem humanen Leptin waren jedoch enttäuschend. Nennenswerte Wirkungen auf das Körpergewicht zeigten sich erst nach hohen Dosen, und selbst dann waren die Effekte von Patient zu Patient sehr unterschiedlich (Gura 1999). Tatsächlich zeigt sich, dass mit Ausnahme der extrem seltenen erblichen Leptindefizienz, adipöse Menschen infolge ihrer hohen Körperfettmasse im Vergleich zu Normalgewichtigen erhöhte Leptinkonzentrationen im Plasma aufweisen (Considine *et al.* 1996). Somit ist nicht Leptinmangel, sondern offensichtlich eine infolge chronisch erhöhter Leptinspiegel entstandene Leptinresistenz ein charakteristisches Merkmal in den meisten Fällen von Adipositas.

Die Aufklärung der Ursachen für eine derartige Leptinresistenz ist aktuell Gegenstand intensiver Forschung. Eine Reihe potentieller Mechanismen, die eine Normalisierung des Körpergewichts trotz hoher Leptinspiegel verhindern, werden postuliert. So nimmt man unter anderem an, dass bei Adipösen der Leptintransport über endotheliale Zellen der Blut-Hirn-Schranke herabgesetzt ist, so dass die Leptinbindung an neuronale Rezeptoren eingeschränkt ist (Banks *et al.* 1999). Für diese Theorie spricht die Beobachtung, dass bei Übergewichtigen im Vergleich zum Serumspiegel niedrige Leptinspiegel in der Cerebrospinalflüssigkeit zu finden sind (Caro *et al.* 1996). Als weiterer möglicher Grund für eine Leptinresistenz wird eine Beeinträchtigung der Signalübermittlung vom Rezeptor, entsprechend der Insulinresistenz bei Diabetes mellitus Typ 2, diskutiert (Bates und Myers 2003). In diesem Zusammenhang sind negative Regulatoren der Leptin-Signaltransduktion wie *Src homology containing Tyrosine Phosphatase-2* (SHP-2, Carpenter *et al.* 1998), *Protein Tyrosine Phosphatase-1B* (PTP1B, Zabolotny *et al.* 2002) und *Suppressor of Cytokine Signaling-3* (SOCS-3, Yasukawa *et al.* 2000) interessant (s. Kapitel 1.5.4).

Es ist eine zurzeit intensiv untersuchte Hypothese, dass diese durch Leptin induzierten negativen Regulatoren des Leptin-Signals bei adipösen Menschen für die Leptinresistenz verantwortlich sind. Um die Funktion dieser Proteine im Leptin-Signalweg zu verstehen, werden nachfolgend die vom Leptin-Rezeptor ausgehenden Signalwege sowie die Mechanismen zur Regulation des Leptin-Signals dargestellt.

1.5.2 Die Leptin-Signalkaskade

Zirkulierendes Leptin vermittelt seine Effekte über Rezeptoren, die vom *diabetes (db)* Gen codiert werden. Leptin-Rezeptoren gehören wie die Rezeptoren für Interleukin-6 (IL-6) und Leukämie-inhibierender Faktor (LIF) zur Familie der Klasse-1 Zytokin-Rezeptoren (Bazan 1989). Aus dem primären Transkript entstehen durch alternatives Spleißen verschiedene Isoformen, die mit LRA-LRF bezeichnet werden (Tartaglia *et al.* 1997). LRA - LRD sowie LRF enthalten identische extrazelluläre Binde- und Transmembrandomänen, sowie die ersten 29 intrazellulären Aminosäuren (Chua *et al.* 1996). Das sekretorische LRE enthält nur die codierende Sequenz für die extrazelluläre Bindedomäne und übernimmt eine Transportfunktion für Leptin (Ge *et al.* 2002). Die membranständigen Isoformen LRA bis LRD sowie LRF werden in zwei Klassen eingeteilt: in die kurzen und die langen Rezeptoren. Während die Funktion der kurzen Rezeptorformen noch weitgehend unklar ist, ist LRB die einzige Isoform, für die eine durch Leptinbindung ausgelöste Signaltransduktion nachgewiesen werden konnte (Friedman und Halaas 1998; Tartaglia 1997).

Die höchste LRB-Dichte konnte im Nucleus arcuatus (ARC) nachgewiesen werden, einem Bereich nahe der Eminentia mediana (Barsh und Schwarz 2002). Dort besteht ein enger Kontakt hypothalamischer Neuronen mit dem Portalkreislauf der Hypophyse, so dass Leptin ohne Transportmechanismus die Blut-Hirn-Schranke passieren kann (Banks *et al.* 1996). Da LRB keine intrinsische enzymatische Aktivität besitzt, wird das Signal über eine an die intrazelluläre Domäne assoziierte Tyrosin-Kinase der Jak-Familie vermittelt (Janus kinase-2, Jak2). LRB verändert durch die Leptinbindung seine Konformation derart, dass die zytoplasmatisch assoziierten Jak2-Moleküle *trans*-phosphoryliert und dadurch aktiviert werden. Die aktivierten Jak2-Moleküle phosphorylieren weitere Tyrosin-Reste innerhalb des LRB/Jak2-Komplexes (Banks *et al.* 2000).

Die nachfolgenden Signalwege setzen sich nun über die Rekrutierung von Signalproteinen mit spezialisierten Phosphotyrosin-Bindedomänen, insbesondere den SH2- (*Src-like homology-2*) Domänen fort. Die Phosphorylierung der Tyrosin-Reste stellt gewissermaßen einen molekularen Schalter dar, da jede SH2-Isoform nur Phosphotyrosin in einem spezifischen Aminosäurekontext erkennt. So bindet beispielsweise die SH2-Domäne des Transkriptionsfaktors STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription-3*) an das phosphorylierte Tyrosinmotiv mit der Konsensussequenz Y(P)XXQ (Songyang *et al.* 1993).

Um die Signalwege des LRb/Jak2-Komplexes genauer zu verstehen ist es wichtig, die Phosphotyrosin-Reste von LRb und Jak2 sowie die SH2-Proteine welche sie rekrutieren, zu kennen. Die intrazelluläre Domäne von LRb besitzt die konservierten Aminosäure-Reste Tyr985, Tyr1077 und Tyr1138, von denen aber nur Tyr985 und Tyr1138 nach der Leptinbindung phosphoryliert werden und Rekrutierungsmotive für Signalmoleküle darstellen (Tartaglia 1997; White *et al.* 1997; Banks *et al.* 2000). Es gibt drei grundsätzliche intrazelluläre Signalwege, die von LRb ausgehen: der Jak/STAT-Signalweg von Tyr1138 und der MAPK-Signalweg von Tyr985 des LRb sowie Signalwege direkt von Phosphotyrosin-Resten an Jak2 (s. *Abbildung 1-5*).

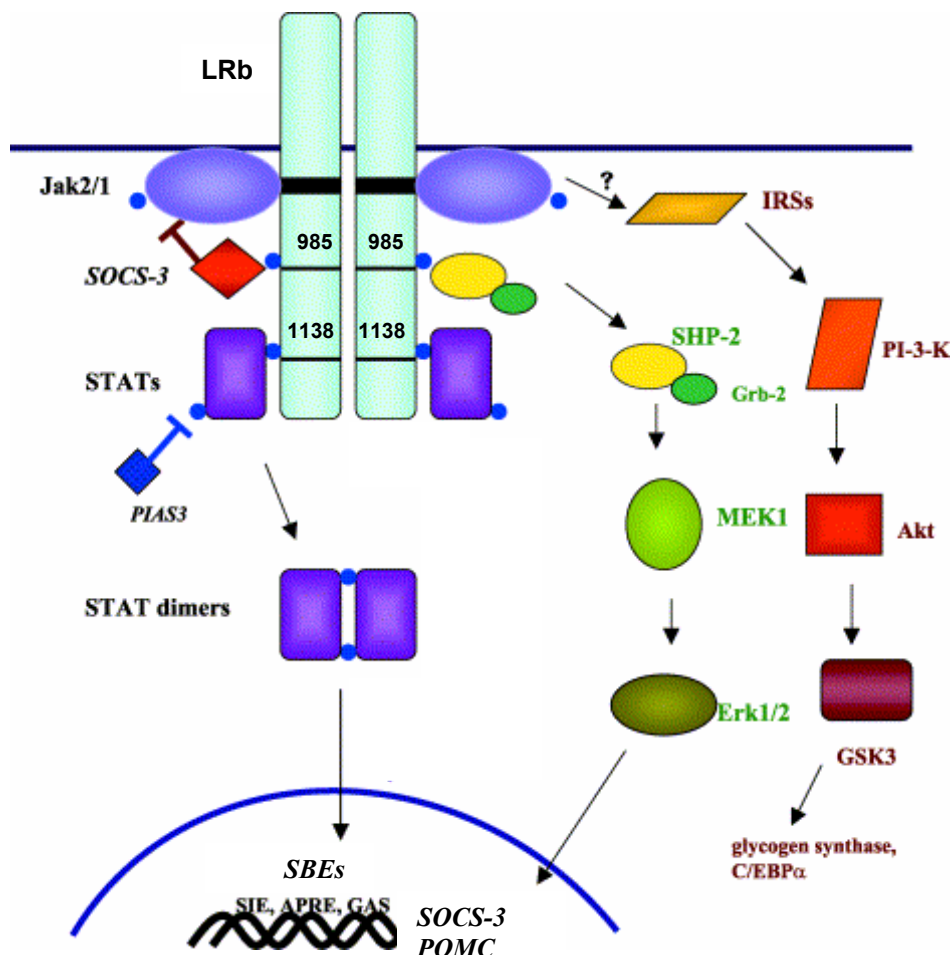


Abbildung 1-5: Vom Leptin-Rezeptor ausgehende Signalwege. Die Bindung von Leptin an den Rezeptor (LRb) aktiviert die LRb assoziierte Jak2. Dies führt zu Autophosphorylierung und zur Phosphorylierung von Tyr985 und Tyr1138 des LRb. Phosphoryliertes Tyr985 rekrutiert SHP-2, das zusammen mit dem Adaptermolekül Grb2 den MAPK-Signalweg aktiviert. Die phosphorylierten Tyrosin-Reste von Jak2 aktivieren den IRS/PI3K-Signalweg, der eine wichtige Verbindung zum Insulin-Signalweg darstellt. Phosphoryliertes Tyr1138 rekrutiert den Transkriptionsfaktor STAT3. Phosphorylierte STAT3-Dimere induzieren durch Bindung an *STAT-Binding Elements* (SBEs) die Transkription verschiedener Gene. Unter ihnen der negative *feedback* Inhibitor *SOCS-3*, der an den LRb/Jak2-Komplex und an Tyr985 des LRb bindet und die Signalweiterleitung inhibiert. Punkte: Phosphatgruppen (modifiziert nach Hegyi *et al.* 2004).

Der Jak/STAT-Signalweg

Die Phosphorylierung von Tyr1138 rekrutiert den Transkriptionsfaktor STAT3 über die SH2-Domäne zum LRB/Jak2-Komplex (Matsuoka *et al.* 1999). Die STAT-Moleküle werden durch Jak2 an Tyr705 und durch verschiedene Serinkinasen zusätzlich an Ser727 phosphoryliert. Die phosphorylierten STAT3-Moleküle bilden Dimere und binden nach Translokation in den Zellkern an palindromische *cis*-regulierende Promoterelemente STAT3-responsibler Gene. Dadurch wird die Transkription der Gene reguliert, die für die verschiedenen Leptinwirkungen verantwortlich sind (White *et al.* 1997; Banks *et al.* 2000). Zu diesen Genen gehört das negative Rückkopplungsprotein SOCS-3 (*Suppressor of Cytokine Signaling-3*). SOCS-3 bindet über seine SH2-Domäne an Tyr985 des LRB (Bjorbaek *et al.* 2000) und mit geringerer Affinität auch an phosphorylierte Tyrosin-Reste von Jak2 (Dunn *et al.* 2005). Über noch unvollständig verstandene Mechanismen wird durch diese Bindung die Signalweiterleitung über den STAT3 Signalweg inhibiert.

Der MAPK-Signalweg

Durch die Phosphorylierung von Tyr985 entsteht eine Bindestelle für die SH2-Domäne der Tyrosin-Phosphatase SHP2 (*Src-like homology-2 containing Protein Tyrosine Phosphatase*). Die phosphorylierten Tyrosin-Reste von SHP2 binden das Adaptermolekül GRB2 (*Growth Factor Receptor-bound Protein 2*). Die aktivierte MEK (*Mitogen-activated Protein Kinase Kinase*) phosphoryliert Erk1/2 (*Extracellular Signal-related Kinase*). Die aktivierten Erk-Proteine translozieren in den Zellkern, wo sie die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden regulatorischen DNA-Elemente vermitteln. Durch die Bindung an Tyr985 stellt SOCS-3 ein Konkurrent an der SHP-2 Bindestelle dar und hemmt den nachfolgenden Signalweg (Bjorbaek *et al.* 2001).

1.5.3 Interaktionen mit dem Insulin-Signalweg

Die durch LRB-Aktivierung phosphorylierten Jak2-Moleküle vermitteln zusätzlich Signale, die unabhängig von Phosphotyrosin-Resten an LRB sind. Ein bislang nur unvollständig beschriebener Jak2-abhängiger Signalweg ist der IRS (*Insulin Receptor Substrate*)/PI3K- (*Phosphatidylinositol-3 Kinase*-) Signalweg. Hierbei stellen phosphorylierte Tyrosin-Reste an Jak2 über IRS-Proteine eine Verbindung zum Insulin-Signalweg her (Niswender *et al.* 2004). IRS-Proteine enthalten zahlreiche Tyrosin-Phosphorylierungsmotive, die Erkennungssequenzen für SH2-Domänen enthaltende Signalproteine wie der PI3-Kinase darstellen. Durch die Assoziation mit der regulatorischen Untereinheit p85 der PI3-Kinase

erhöhen IRS deren katalytische Aktivität. Die PI3-Kinase produziert Phosphatidyl-Inositoltriphosphate (PIP3) wodurch PIP3-abhängige Serin- und Threonin-Kinasen wie PDK-1 (*3-Phosphoinositid-dependent Kinase-1*) und PKC (*Protein Kinase C*) aktiviert werden (s. *Abbildung 1-5*). Diese sind ein Signal für die Serin-/Threonin-Kinase Akt, welche über die Phosphorylierung verschiedener Zielmoleküle wie die *Glykogen-Synthase Kinase* (GSK3), zahlreiche biologische Insulin-Wirkungen vermittelt (White 2003).

1.5.4 Regulation des Leptin-Signals

Der Jak/STAT-Signalweg wird durch unterschiedliche Liganden wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone aktiviert und ist dadurch an zahlreichen zellulären Prozessen wie der Hämatopoese, Immunregulation und Onkogenese beteiligt. Aus diesem Grund sind effektive Regulationsmechanismen von entscheidender Bedeutung, um eine unkontrollierte Aktivierung von Zellen zu verhindern. Allgemein werden verschiedene Mechanismen zur Inhibition von Signaltransduktionsprozessen diskutiert (Yoshimura 2005):

- a) *Endozytose*: der Ligand wird gemeinsam mit dem Rezeptor internalisiert und somit die Gesamtmenge aktivierbarer Rezeptoren auf der Zelloberfläche reduziert
- b) *Dephosphorylierung von Signalmolekülen*: zytoplasmatische Tyrosin-Phosphatasen können auf allen Ebenen der intrazellulären Signaltransduktion den Phosphorylierungsstatus von Rezeptor, Janus-Kinasen und STAT-Transkriptionsfaktoren regulieren
- c) *Intrazelluläre Inhibitoren*: Proteine mit inhibitorischer Funktion können mit Signalmolekülen interagieren. Dabei werden einige von ihnen als *feedback* Inhibitoren durch die Signalkaskade selber induziert
- d) *Degradationsprozesse*: Signalmoleküle können durch Ubiquitin- oder SUMO- (*Small Ubiquitine-like Modifier*) Modifikation der Degradation zugeführt und somit einer weiteren Aktivierung entzogen werden

Im Zusammenhang mit der Regulation des Leptin-Signals spielt der bereits erwähnte *feedback*-Inhibitor SOCS-3 eine wichtige Rolle. Daneben konnten die Phosphatasen SHP-2 (*Src-like Homology-2-containing Protein Tyrosine Phosphatase*; Carpenter *et al.* 1998) und PTP1B (*Protein Tyrosine Phosphatase-1B*; Zabolotny *et al.* 2002) als regulatorische Faktoren im Leptin-Signalweg identifiziert werden. Auch intrazelluläre Inhibitoren aus der Familie der PIAS-Proteine (*Protein Inhibitor of Activated STAT*) sind an der Hemmung der Leptin-Signaltransduktion beteiligt (Chung *et al.* 1997).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Leptin sowie die nachgeschalteten Signalmoleküle der Leptin-Signalkaskade sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Eine Dekompensation der peripheren Körpergewichtsregulation wie sie bei Adipositas zu beobachten ist, könnte in einer inadäquaten Gegenregulation durch Leptin begründet sein. Durch den Nachweis einer solchen Fehlregulation ließe sich ein gezielter und pathophysiologisch abgesicherter pharmakologischer Therapieansatz der Adipositas entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Gene der Leptin-Signalkaskade auf eine mögliche Beteiligung an der Entstehung frühmanifester Adipositas untersucht. Hierzu wurden die Allel- und Genotyphäufigkeiten von Sequenzvarianten in den entsprechenden Kandidatengenomen bei extrem übergewichtigen Kindern und Jugendlichen sowie untergewichtigen Kontrollpersonen analysiert. Die Ziele waren im Einzelnen:

Analyse des Kandidatengens *SOCS-3*

- *in silico* Analyse zur Aufklärung von Genstruktur und der 5' untranslatierten Region (5' UTR) einschließlich regulatorischer Elemente und Untersuchung hinsichtlich Sequenzvarianten mit Hilfe der Einzelstrangkonnformations-Analyse (*Single-stranded Conformation Analysis*, SSCA)
- Genotypisierung der identifizierten Varianten bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie untergewichtigen Kontrollpersonen mit Hilfe entsprechender Methoden (SSCA; Restriktionsfragment Längenpolymorphismus, RFLP) und Durchführung von Assoziations- bzw. Transmission-Disequilibrium-Tests (TDT)

Analyse von Datenbank-SNPs der Kandidatengene *IRS-1* und *IRS-2*

- Literaturrecherche und Suche nach geeigneten Datenbank-SNPs
- Genotypisierung der ausgewählten SNPs bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie untergewichtigen Kontrollpersonen per RFLP und Durchführung von Assoziationstests bzw. eines TDT

Analyse von Datenbank-SNPs weiterer Kandidatengene der Leptin Signalkaskade

- Literaturrecherche und Datenbanksuche nach weiteren plausiblen Kandidatengenomen der Leptin-Signalkaskade
- Hochdurchsatz-Genotypisierung geeigneter SNPs mit Hilfe der MALDI-TOF (*Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight*) Massenspektrometrie bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie untergewichtigen Kontrollpersonen und Durchführung von Assoziationstests bzw. eines TDT

2 Material und Methoden

2.1 Probandenkollektiv

2.1.1 Rekrutierung der Probanden

Für die vorliegenden Studien wurden Probanden sowie gegebenenfalls deren Eltern und Geschwister durch Mitarbeiter der Klinischen Forschergruppe (Marburg) in folgenden Kliniken rekrutiert (Hinney *et al.* 1997):

- Klinik Hochried, Fachklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Murnau: extrem adipöse Kinder und Jugendliche
- Adipositas Rehabilitationszentrum Insula, Berchtesgaden: extrem adipöse Kinder und Jugendliche
- Spessart-Klinik, Bad Orb: extrem adipöse Kinder und Jugendliche
- Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie und -psychotherapie, Philipps-Universität Marburg: extrem adipöse Kinder und Jugendliche und untergewichtige Studenten

Für die Aufnahme in die einzelnen Studiengruppen galten folgende Einschlusskriterien:

- extrem adipöse Kinder und Jugendliche: frühmanifeste Adipositas mit einem BMI über der 90. alters- und geschlechtsspezifischen Perzentile
- untergewichtige Kontrollgruppe: BMI unter der 15. alters- und geschlechtsspezifischen Perzentile sowie Ausschluss einer Essstörung

Als Einschlusskriterien für die Familienuntersuchungen galten:

- mindestens ein Kind in der Familie mit einem BMI über der 90. alters- und geschlechtsspezifischen Perzentile
- mindestens ein Geschwisterkind mit einem BMI über der 90. alters- und geschlechtsspezifischen Perzentile
- vorausgegangene SNP- bzw. Mikrosatelliten-Typisierungen sind mit den Vererbungsregeln nach Mendel vereinbar

Unabhängig von der Gewichtsklasse galten als Ausschlusskriterien:

- organischen Erkrankungen, die das Körpergewicht beeinflussen
- eine Dauermedikationen, die das Körpergewicht beeinflusst (ausgenommen Kontrazeptiva)
- Nikotinkonsum von über 10 Zigaretten pro Tag

Mit den Probanden und gegebenenfalls ihren Eltern und Geschwistern wurden Befragungen zur Erfassung von Gewichtsanamnese, soziodemographischer Daten und organischer Erkrankungen durchgeführt. Alle Studienteilnehmer wurden anhand eines Informationsblattes über Zweck und Ziel der Studie aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung. Bei Minderjährigen wurde diese von mindestens einem Erziehungsberechtigten eingeholt. Die personenbezogenen Daten wurden verschlüsselt und gemäß dem gültigen Datenschutzgesetz verwahrt. Die Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Ein positives Votum zur Durchführung der Studie liegt von der Ethik-Kommission der Philipps-Universität Marburg vor.

2.1.2 Deskriptive Statistik der Studiengruppen

Die deskriptive Statistik der untersuchten Studiengruppen ist nachfolgender Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 2-1: Deskriptive Statistiken der untersuchten Studiengruppen

Studiengruppen	Anzahl (Geschlecht)	Mittleres Alter/ SD (Jahre)	Mittlerer BMI/ SD (kg/m ²)	Mittlere BMI- Perzentile/ SD
Studiengruppen zur Assoziationsanalyse von <i>SOCS-3</i>, <i>IRS-1</i> und <i>IRS-2</i>				
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche	181 (90 m, 91 w)	14,31/ 2,40	35,60/ 6,12	99,98/ 0,15
Untergewichtige Kontrollpersonen	278 (137 m, 141 w)	24,98/ 3,68	18,23/ 1,11	3,97/ 3,49
Familienanalysen Indexpatienten und Geschwister	987 (445 m, 542 w)	14,00/ 3,69	31,06/ 6,00	98,60/ 2,28
Studiengruppen zur SNP-Analyse weiterer Kandidatengene				
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche	184 (92 m, 92 w)	14,36/ 2,42	45,65/ 6,11	99,98/ 6,11
Untergewichtige Kontrollpersonen	184 (92 m, 92 w)	25,57/ 3,84	18,30/ 1,07	3,84/ 3,27
Trioanalysen Indexpatienten	368 (157 m, 211 w)	13,71/ 3,08	31,82 / 6,05	98,84/ 1,93

SD: Standardabweichung; m: männlich; w: weiblich

2.2 *in silico* Genanalysen

2.2.1 Allgemeine Informationsquellen

DNA-Sequenzen und Informationen zu Funktion und Charakteristika der Kandidatengene wurden, soweit nicht anders beschrieben, aus folgenden frei zugänglichen und öffentlichen Datenbanken bezogen:

- National Center for Biotechnology Information (NCBI; URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
- ENSEMBL Genome Browser (URL <http://www.ensembl.org>)
- UCSC Genome Bioinformatics (URL <http://genome.ucsc.edu>)

Weiterhin wurden Informationen aus Fachliteratur und Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Zeitschriften bezogen. Die Publikationen wurden mit Hilfe der Online-Literaturdatenbank *PubMed* der *National Library of Medicine* (NCBI, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) recherchiert und anhand entsprechender Quellenangaben aus der Primärliteratur erfasst.

2.2.2 Analyse von Datenbank-SNPs

Die Suche nach veröffentlichten SNPs in den Kandidatengenomen wurde anhand der folgenden frei zugänglichen Internet-Datenbanken durchgeführt:

- Institut für Humangenetik, TU München und GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit Neuherberg (URL <http://ihg.gsf.de/ihg/snps.html>)
- IIPGA Innate Immunity in Heart, Lung and Blood diseases (URL <http://snpper.chip.org>)
- NCBI (URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)

Die Auswahl von Datenbank-SNPs für die Kandidatengenanalysen erfolgte nach den aufgeführten Kriterien:

- ausschließlich bi-allelische Polymorphismen
- möglichst in kaukasischer Population validiert
- genomische SNPs, d.h. keine cDNA SNPs
- nicht-redundante SNPs, d.h. im menschlichen Genom einmalig vorkommend
- möglichst im kodierenden Bereich oder im Promoter lokalisierte SNPs
- Allelfrequenz des seltenen Allels mindestens 20%, optimal 50%
- validierte *missense* SNPs auch unabhängig von der Frequenz

2.2.3 Auswahl von Oligonukleotid-Primern und Restriktionsenzymen

Die *in silico* Auswahl der Oligonukleotid-Primer zur Durchführung der PCR (Polymerase Kettenreaktion) erfolgte mit Hilfe des Internet-Programms *Primer3* des *Whitehead Institute for Biomedical Research Cambridge, USA* (Rozen und Skaletsky 2000; URL http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

Die Primer für die ARMS (*Amplifikation-Refractory Mutation System*) PCR wurden mit Hilfe des Internet-Programms *ARMS Primer Design* generiert (University Southampton, School of Medicine, Human genetics division, Southampton, UK; URL https://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html). Die ausgewählten Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert (URL http://www.mwgbio.com/html/s_synthesis/s_primer_design.shtml).

Die Suche nach geeigneten Restriktionsenzymen für die RFLP-Analyse erfolgten mit *NEBcutter* (New England Biolabs; URL <http://tools.neb.com/NEBcutter/index.php3>) und *Web-cutter* (URL <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2>). Analysen von DNA-Sequenzen wurden mit der Software *Chromas* (Version 2.23, Technelysium Pty. Ltd.) durchgeführt.

2.2.4 Promoter Vorhersagen und Analyse von Promoterelementen

Die Promoteranalysen von *SOCS-3* erfolgten über das frei zugängliche Internet-Programm *PromoterInspector* (Genomatix; URL <http://www.genomatix.de>).

2.3 Gewinnung und Aufarbeitung von DNA-Proben

Die Isolierung von genomischer DNA aus Blutproben der Probanden erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Miller und Mitarbeitern (1988). Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen ist in *Tabelle 2-2* aufgeführt. Es wurden 10 bis 20 ml durch EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) antikoaguliertes Blut mit 30 ml eisgekühltem Erythrozyten-Lysepuffer (*Red Cell Lysis Buffer*, RCLB) vermischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Leukozyten durch zehnminütige Zentrifugation bei 4000 Upm (Umdrehungen pro Minute) und 4°C sedimentiert. Der Überstand mit den darin enthaltenen Erythrozyten-Zelltrümmern wurde verworfen, das Leukozytensediment in 25 ml RCLB aufgenommen und gewaschen. Anschließend wurde das Gemisch erneut bei 4°C und 4000 Upm zentrifugiert und das Zellsediment in 5,5 ml Pronase-E Reaktionsmix über Nacht schüttelnd im Wasserbad bei 37°C gelöst. Um den proteolytischen Abbau der Zellproteine zu beschleunigen, wurden der Lösung 5 ml SE-Puffer hinzugegeben und das

Gefäß im Wasserbad bei 55°C mindestens 10 Minuten unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden zur Ausfällung der Proteine 2,5 ml einer 5 M Natriumchlorid (NaCl) Lösung zu der klaren Lösung gegeben, umgehend 15 Sekunden lang geschüttelt und dann 15 Minuten bei 4000 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit dem 2,5-fachen Volumen eiskaltem 98%-igem Ethanol gefällt. Die in der Interphase ausgefällte DNA wurde mit einem Glashaken aufgenommen, in 70%-igem Ethanol gewaschen und in 50 bis 1000 µl TE-Puffer 1 bis 2 Stunden bei 50°C im Wasserbad gelöst.

RCLB	10 mM Tris-HCl 5 mM MgCl ₂ 10 mM NaCl pH 7,6	<i>Tabelle 2-2: Verwendete Puffer und Lösungen zur Isolierung genomischer DNA aus Blutproben</i>
Pronase E Mix	5 ml SE-Puffer 0,25 mg Pronase E 500 µl SDS 10%	
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM EDTA pH 8,0	
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0	

Um einheitlich konzentrierte DNA-Lösungen herstellen zu können, wurde die Konzentration der im TE-Puffer gelösten DNA im Spektralphotometer bestimmt. Dazu wurde 1µl der DNA-Lösung mit *aqua bidest.* um den Faktor 200 verdünnt und die Extinktion in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Wellenlänge von 260 nm ($E_{260 \text{ nm}}$) gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, so dass sich die DNA-Konzentration nach folgender Formel berechnen lässt:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 50\mu\text{g/ml} \times E_{260 \text{ nm}}$$

Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde ein Teil der DNA-Lösungen mit *aqua bidest.* auf eine Endkonzentration von 20 ng/µl verdünnt. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte bei -80°C. Zur einfacheren Handhabung wurden DNA-Verdünnungen auf Mikrotiterplatten pipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C tiefgefroren.

2.4 *in-vitro* Genamplifizierung mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) stellt eine Methode dar, mit der definierte Bereiche einer bekannten DNA-Sequenz *in vitro* exponentiell vervielfältigt werden können. Das Prinzip beruht auf einer zeitlich genau definierten, zyklischen Wiederholung drei aufeinander folgender Schritte.

Bei Temperaturen um 95°C zerfällt der DNA-Doppelstrang in die beiden komplementären Einzelstränge. Nach der Denaturierung binden synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die komplementär zu kurzen Abschnitten des zu amplifizierenden Fragmentes sind (*Primer*), an die DNA-Einzelstränge und rahmen das Zielgebiet ein. Der Vorwärts- (*forward*-) Primer definiert das 5'-Ende des einen Stranges während der Rückwärts- (*reverse*-) Primer das 3' Ende des anderen Stranges bildet. Diese beiden Primer sind Startpunkte für die nachfolgende DNA-Strangsynthese, da an ihren freien 3' Hydroxy-Gruppen die DNA-Polymerase entsprechende Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) anbauen kann. In jedem Zyklus dient die neusynthetisierte DNA als zusätzliche Matrize, so dass eine exponentielle Vermehrung der Ausgangs-DNA möglich ist. Damit das Enzym nicht durch die hohen Denaturierungstemperaturen zerstört wird, verwendet man eine thermostabile DNA-Polymerase aus dem Mikroorganismus *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase), deren Temperaturoptimum bei 70 bis 75 °C liegt.

2.4.1 Auswahl von Oligonukleotid-Primern

Um eine optimale Ausbeute an DNA-Amplifikaten zu erhalten, sollten die verwendeten Oligonukleotide folgende Eigenschaften besitzen (Rychlik 1993):

- die Länge der Primer sollte etwa bei 19 bis 35 bp liegen
- der Gehalt an Guanin und Cytosin sollte 40 bis 60 % betragen
- palindromische Sequenzabschnitte und tandemförmige Basenwiederholungen der Primer untereinander und innerhalb eines Primers sollten vermieden werden, um eine Bildung von Dimeren oder Rückfaltung des Primers durch intramolekulare Wasserstoffbrücken zu minimieren
- am 3' Ende der Primer sollte eine Aufeinanderfolge von mehr als 3 Guanin- bzw. Cytosin-Basen vermieden werden
- die Schmelztemperatur (T_m) beider Primer sollte ungefähr gleich sein
- die Zielsequenz der Primer sollte nur einmalig im Genom vorkommen

Für das Mutationsscreening von *SOCS-3* wurden nach den oben genannten Kriterien Primer ausgewählt, die den codierenden Bereich (*SOCS-3 3d for/rev* und *SOCS-3 3 for/rev*) bzw. den Promoterbereich (*SOCS-3 prom for/rev*) flankieren (s. *Tabelle 2-3*). Zur RFLP- (Restriktionsfragment Längenpolymorphismus-) Genotypisierung der Datenbank-SNPs in *IRS-1* und *IRS-2* wurden Primer gewählt, welche die entsprechenden SNPs flankieren und deren PCR-Produkte nach der Restriktion mit einem geeigneten Restriktionsenzym eine eindeutige Zuordnung der Genotypen ermöglichen (s. *Tabelle 2-3*). Von den entsprechenden DNA-Primern wurden mit *aqua bidest.* Stammlösungen mit einer Konzentration von 1000 pmol/μl hergestellt und bei -20°C gelagert. Von diesen Stammlösungen wurden Gebrauchslösungen in 25 pmol/μl Verdünnungen hergestellt und bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 2-3: Verwendete PCR-Primer

Primerbezeichnung		Sequenz 5'→3'	Produktgröße
SOCS-3	<i>prom for</i>	ctc gtc gcg ctt tgt ct	345 bp
	<i>prom rev</i>	ggg agg gga cca gga g	
	<i>3d for</i>	gtt ccg ggc act caa cg	497 bp
	<i>3d rev</i>	cag ctt gag cac gca gtc	
	<i>3 for</i>	agt ctg gga cca aga acc tg	499 bp
	<i>3 rev</i>	ctt gtg ctt gtg cca tgt g	
IRS-1	<i>rs1801278 for</i>	gca gcc tgg cag gag ag	221 bp
	<i>rs1801278 rev</i>	ctc acc tcc tct gca gc	
IRS-2	<i>rs18053097 for</i>	tct ccg ctc tcc gac tac at	438 bp
	<i>rs1805097 rev</i>	ctc gac tcc cga cac ctg	

for (forward): Vorwärtsprimer; *rev* (reverse): Rückwärtsprimer; 5' → 3': Transkriptionsrichtung

2.4.2 Durchführung der PCR

Der Reaktionsansatz für die PCR wurde zunächst nach einem Standardprotokoll in einem Reaktionsvolumen von 25 μl durchgeführt. Die in *Tabelle 2-4* angegebenen Reagenzien wurden auf Eis pipettiert und die *Taq*-Polymerase dem Reaktionsgemisch zuletzt hinzugefügt. Unmittelbar im Anschluss erfolgte die Amplifikation im DNA-Thermocycler. Zunächst wurde das Reaktionsgemisch 5 Minuten lang bei 94°C erhitzt, um eine vollständige Denaturierung der DNA zu gewährleisten. Danach schlossen sich 30 Zyklen bestehend aus jeweils 30 Sekunden Denaturierung, Primer-Anlagerung und Kettensynthese an.

Zur Abschätzung der Hybridisierungstemperatur (Annealingtemperatur, T_{Ann}) diene folgende Formel, nach der für jedes im Oligonukleotid vorhandene Adenin oder Thymin 2°C und für jedes Guanin oder Cytosin 4°C berechnet werden:

$$T_{Ann} (^{\circ}\text{C}) = 2x \text{ nA} + 2x \text{ nT} + 4x \text{ nG} + 4x \text{ nC}$$

(nA: Anzahl der Adeninbasen im Primer; nT: Anzahl der Thyminbasen im Primer; nG: Anzahl der Guaninbasen im Primer; nC: Anzahl der Cytosinbasen im Primer)

Der abschließende Syntheseschritt zur Fertigstellung inkomplett gebildeter DNA-Kopien erfolgte für 10 Minuten bei 72°C. Nach der Reaktion wurde der PCR-Ansatz auf 4°C abgekühlt und bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt.

Tabelle 2-4: Standard PCR-Bedingungen

PCR-Ansatz	PCR-Reaktion			
50 ng DNA 1x PCR-Reaktionspuffer 37,5 pmol MgCl ₂ 12,5 pmol Vorwärts-Primer 12,5 pmol Rückwärts-Primer 0,02 pmol dNTPs 0,5 Unit <i>Taq</i> -Polymerase <i>aqua bidest.</i> ad 25 µl	Denaturierung	5 min.	94°C	1 Zyklus
	Denaturierung	30 sek.	94°C	30 Zyklen
	Annealing	30 sek.	T_{Ann}	
	Elongation	30 sek.	72°C	
	Elongation	10 min.	72°C	1 Zyklus
	Kühlung	∞	4°C	∞

Da die PCR eine sehr sensitive Methode ist, die anfällig für DNA-Verunreinigungen ist, wurden die verschiedenen Arbeitsschritte räumlich getrennt. Die DNA-Extraktion und das Ansetzen des PCR-Reaktionsansatzes wurde in einem „Vor-PCR“ Bereich durchgeführt, während alle nachfolgenden Schritte wie PCR-Reaktion, Restriktion und Gelelektrophorese der PCR-Produkte im „Nach-PCR“ Bereich durchgeführt wurden. Die verwendeten Materialien und Geräte der beiden Bereiche wurden nicht ausgetauscht. Zur Kontrolle von Kontaminationen mit Fremd-DNA wurde bei jeder PCR-Reaktion eine Negativkontrolle ohne Zugabe von DNA mitgeführt.

2.4.3 Optimierung der PCR-Reaktion

Wenn die PCR nach dem Standardprotokoll kein optimales Ergebnis lieferte, wurden verschiedene Parameter, die Einfluss auf die Spezifität und Effektivität der Reaktion haben, variiert:

Hybridisierungstemperatur: Die Hybridisierungstemperatur von Vor- und Rückwärts-Primer sollten im Idealfall ungefähr gleich sein, ansonsten ist die optimale Temperatur in der Nähe des Mittelwertes beider Werte zu erwarten. Traten bei der errechneten

Hybridisierungstemperatur unspezifische DNA-Fragmente auf, wurde die Temperatur schrittweise erhöht. Um mehrere Optimierungsschritte zeit- und materialsparend durchführen zu können wurde ein Thermocycler verwendet, der durch einen wählbaren Temperaturgradienten von bis zu 15°C ermöglicht, die Reaktionsansätze bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen gleichzeitig zu testen.

Ionenkonzentration: Die Magnesium-Konzentration des PCR-Ansatzes sollte zwischen 1,5 und 4 mM liegen, da es bei niedrigeren Konzentrationen zur Inaktivierung der *Taq*-Polymerase kommen kann und bei höheren die Bildung von Nebenprodukten steigt. Kationen wie Kalium oder Magnesium lagern sich an die negativ geladenen Phosphatgruppen des Desoxyribose-Rückgrats an und vermindern so die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den Strängen. Dies führt zu einer verbesserten Anlagerung der Oligonukleotid-Primer an die Matrize. Zur Optimierung der PCR-Reaktion wurden verschiedene Konzentrationen von Magnesium-Ionen durch Zugabe von Magnesiumchlorid (MgCl_2) und verschiedene Konzentrationen von Kalium-Ionen durch Zugabe des polymerasespezifischen Puffers getestet.

Primerkonzentration: Eine hohe Primerkonzentration birgt das Risiko für eine unspezifische Anlagerung an die Matrize, was zu unspezifischen PCR-Produkten führen kann. Als Ausgangskonzentration wurden 0,1 bis 0,2 μM Primer in dem jeweiligen Reaktionsansatz eingesetzt und je nach Spezifität des PCR-Produktes variiert.

Spezifitätssteigernde Additive: Die Ursache unspezifischer Amplifikate bei der PCR Reaktion liegt häufig in stabilen Sekundärstrukturen und einem hohem Guanin-Cytosin Gehalt der Zielsequenz begründet. Diese Strukturen können sowohl Denaturierung, Primeranlagerung als auch die Kettenverlängerung erschweren. Durch Zugabe von denaturierenden Agenzien wie Dimethylsulfoxid (DMSO, 5%) und Formamid (5%), Glycerol (15%) oder 7-deaza-GTP können die Stränge in denaturierter Form stabilisiert und die Bildung von Sekundärstrukturen verhindert werden (Hung *et al.* 1990; Sarkar *et al.* 1990). Rinderserumalbumin (BSA, 1,5 mg/ml) wirkt als unspezifischer Enzymstabilisator und ist in der Lage, PCR-Inhibitoren wie EDTA, Heparin und SDS zu binden.

Die PCR-Reaktionen wurden soweit optimiert, bis sie eine möglichst spezifische und hohe Ausbeute lieferten. Die PCR-Bedingungen, die sich für die jeweiligen Fragmente als optimal erwiesen haben, sind in *Tabelle 2-5* aufgeführt.

Tabelle 2-5: Optimierte PCR- Bedingungen für die jeweiligen PCR-Fragmente

DNA-Fragment	PCR-Ansatz	Amplifikations- bedingungen
<i>SOCS-3 Prom</i>	2,5 µl DNA (20 ng/µl) 2,5 µl PCR-Puffer (10x) 1,0 µl MgCl ₂ (20 mM) je 1,0 µl Primer (25 pmol/µl) 0,30 µl dNTP (20 mM/µl) 1,25 µl DMSO (5%) 0,1 µl <i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl) <i>aqua bidest.</i> ad 25 µl	10 min. 95°C 30 sek. 95°C 30 sek. 58,5°C 30 sek. 72°C 10 min. 72°C 35 Zyklen
<i>SOCS-3 3d</i>	2,5 µl DNA (20 ng/µl) 2,5 µl PCR-Puffer (10x) 1,5 µl MgCl ₂ (20 mM) je 0,50 µl Primer (25 pmol/µl) 0,30 µl dNTP (20 mM/µl) 0,1 µl <i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl) <i>aqua bidest.</i> ad 25 µl	10 min. 95°C 30 sek. 95°C 30 sek. 62°C 30 sek. 72°C 10 min. 72°C 35 Zyklen
<i>SOCS-3 3</i>	2,5 µl DNA (20 ng/µl) 2,5 µl PCR-Puffer (10x) 1,5 µl MgCl ₂ (20 mM) je 0,25 µl Primer (25 pmol/µl) 0,30 µl dNTP (20 mM/µl) 0,1 µl <i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl) <i>aqua bidest.</i> ad 25 µl	5 min. 95°C 30 sek. 95°C 30 sek. 62°C 30 sek. 72°C 10 min. 72°C 35 Zyklen
<i>IRS-1</i> <i>rs1801278</i>	2,5 µl DNA (20 ng/µl) 2,5 µl PCR-Puffer (10x) 1,5 µl MgCl ₂ (20 mM) je 0,25 µl Primer (25 pmol/µl) 0,30 µl dNTP (20 mM/µl) 0,1 µl <i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl) <i>aqua bidest.</i> ad 25 µl	10 min. 95°C 30 sek. 95°C 30 sek. 65°C 30 sek. 72°C 10 min. 72°C 35 Zyklen
<i>IRS-2</i> <i>rs1805097</i>	2,5 µl DNA (20 ng/µl) 2,5 µl PCR-Puffer (10x) 2,5 µl MgCl ₂ (20 mM) je 0,25 µl Primer (25 pmol/µl) 0,30 µl dNTP (20 mM/µl) 1,25 µl DMSO (5%) 0,1 µl <i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl) <i>aqua bidest.</i> ad 25 µl	10 min. 95°C 30 sek. 95°C 30 sek. 58°C 30 sek. 72°C 10 min. 72°C 35 Zyklen

2.5 Agarose Gelelektrophorese

Zur Größenkontrolle der PCR-Produkte erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese. Durch dieses Verfahren können DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt und sichtbar gemacht werden können. Da Nukleinsäuren bei neutralem pH-Wert durch die Phosphatgruppen im Phosphodiesterückgrat als polyanionische Moleküle vorliegen, wandern sie im elektrischen Spannungsfeld in Richtung Anode. Dabei ist die zurückgelegte Wegstrecke umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare.

Als Trennmateriel für die DNA-Moleküle wird üblicherweise eine Gelmatrix aus dem natürlichen Polysaccharid Agarose eingesetzt. Die Trennschärfe der Gelelektrophorese hängt von der Porenweite der verwendeten Matrix ab, wobei das Maschenwerk umso enger ist, je höher die Konzentration an Agarose ist. Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten im Größenbereich zwischen 200 und 600 bp wurde eine 2,5%-ige Agarosekonzentration gewählt. Zur Herstellung des Gels wurden 5 g Agarose mit 200 ml TAE-Puffer (0,04 M Tris-HCl, 0,1% Eisessig, 0,01 M EDTA) aufgekocht bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlen auf etwa 60°C wurden 20 µl einer 1%-igen Ethidiumbromidlösung hinzugegeben und nach kurzem Schütteln in vorgefertigte Gelschlitten gegossen. In die noch flüssige Gelmatrix wurden die Kämme eingesetzt. Nach Erstarren der Gelmatrix wurden die Kämme entfernt und das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte horizontale Elektrophoresekammer gebracht. Um das Auftragen der Proben in die Taschen des Agarosegels zu erleichtern, wurden die Ansätze mit 1/6 Volumen Auftragspuffer (15 % Bromphenolblau, 0,25 % Ficoll Typ 400, 0,25 % Xylencyanol) versetzt. Die Laufzeiten betrugen zwischen 20 und 60 Minuten bei einer Gleichspannung von 250 Volt. Die aufgetrennten DNA-Banden werden durch den in die Doppelhelix interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht als orange fluoreszierende Banden sichtbar. Ein mitgeführter DNA-Längenmarker diente zur Größenabschätzung der aufgetrennten DNA Fragmente. Zur Dokumentation wurden die Agarosegele auf einem UV-Licht Transilluminator fotografiert.

2.6 Mutationsscreening

2.6.1 Einzelstrangkonnektions-Analyse

Die Einzelstrangkonnektions-Analyse (*Single-stranded Conformation Analysis*, SSCA) ermöglicht die Detektion von Sequenzveränderungen in bestimmten DNA-Abschnitten. Dieses Verfahren wurde erstmalig 1989 von Orita und Mitarbeitern (1989) beschrieben und hat sich seitdem als sensitive Methode zur Mutationssuche etabliert. Die Technik beruht auf der Eigenschaft der DNA, in Einzelstrangform eine bestimmte dreidimensionale (Sekundär-) Struktur einzunehmen, die auf der Primärstruktur des jeweiligen Stranges beruht und somit spezifisch für eine entsprechende Basenabfolge ist. Schon bei der Veränderung einer einzigen Base in dieser Sequenzabfolge ist in den meisten Fällen eine andere Sekundärstruktur als beim Wildtyp zu beobachten. Dies hat zur Folge, dass die Einzelstränge unterschiedlich schnell entlang eines Spannungsgradienten durch eine nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelmatrix wandern (s. *Abbildung 2-1*). Da sich von dem abweichenden Bandenmuster nicht auf Art und Position der zugrunde liegenden Veränderung der Sequenz schließen lässt, ist als nächster Schritt eine Sequenzierung des entsprechenden DNA-Fragmentes zur Spezifizierung der Basenveränderung notwendig.

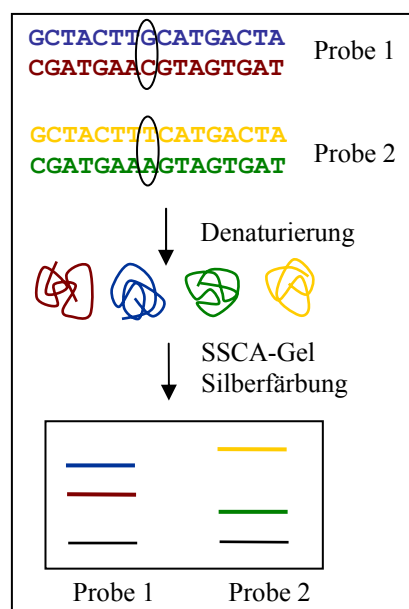


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der SSCA. Die DNA-Fragmente werden denaturiert und auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Schon ein einziger Basenaustausch kann die Sekundärstruktur und damit das Laufverhalten der DNA-Einzelstränge verändern. Nach der Silberfärbung zeigen Mutationsträger ein vom Wildtyp abweichendes Bandenmuster.

Die SSCA wurde zur systematischen Suche nach Sequenzvarianten in den *SOCS-3* PCR-Fragmenten durchgeführt. Um eine höhere Sensitivität zu erreichen (s. *Kapitel 4.7*), wurde bei PCR-Produkten, die eine Größe von 350 bp überschritten, zuvor ein Restriktionsverdau

durchgeführt. Die Enzyme und Restriktionsbedingungen, die hierbei zur Anwendung kamen, sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen (s. *Tabelle 2-6*).

Tabelle 2-6: Restriktion der SOCS-3 PCR-Fragmente in geeignete Größen für die SSCA

PCR-Fragment	Produktgröße	Enzym und Restriktionsbedingungen	Restriktionsfragmente
SOCS-3-3d	497 bp	<i>GsuI</i> 5' ..CTGGAG (N) ₁₆ ↓ ..3'	274 bp
		3' ..GACCTC (N) ₁₄ ↑ ..5'	223 bp
		2 h bei 30°C in 1x BufferB ⁺ [#]	
SOCS-3-3	499 bp	<i>NaeI</i> 5' ..GCC↓GGC ..3'	279 bp
		3' ..CGG↑CCG ..5'	220 bp
		2h bei 37°C in 1x NEBuffer [*]	

[#] 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,5; ^{*} 10mM Bis-Tris Propane-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, pH 7,0

Herstellung des Polyacrylamidgels und Durchführung der SSCA

Die Gelmatrix für die Polyacrylamid- (PAA) Gele wurde aus gebrauchsfertigen Acrylamid-Bisacrylamid Lösungen (37,5:1) hergestellt. Für einen 50 ml Ansatz eines 15%igen nicht-denaturierenden PAA-Gels wurden die in *Tabelle 2-7* angegebenen Lösungen in ein 50 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Der Ansatz wurde vorsichtig geschwenkt, so dass keine Luftblasen entstehen. Durch Zugabe von Ammoniumperoxidsulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurde die Polymerisationsreaktion gestartet und die Gellösung nach leichtem Schwenken umgehend zwischen die Glasplatten der SSCA-Apparatur gegossen. Die Platten wurden zuvor mit *aqua bidest.* und Isopropanol gereinigt und seitliche Abstandhalter von 0,75 mm sowie ein Kamm zur Aussparung der Probenaschen eingesetzt. Nach einer Polymerisationszeit von 1 bis 2 Stunden wurde der Probenkamm entfernt, die Taschen mit *aqua bidest.* ausgespült und das Gel bis zur weiteren Verwendung mit Frischhaltefolie abgedeckt.

10x TBE-Puffer	0,9 M Tris-HCl 0,9 M Borsäure 0,2 M EDTA pH 8,3
Beladungspuffer	20 % Formamid (deionisiert) 1 % Glyzerin 0,25 % Bromphenolblau 0,5 M EDTA
15% PAA Gel	18,75 ml Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1) 2,5 ml 10x TBE 28,75 ml HPLC-aufgereinigtes Wasser 500 µl APS 10% 34 µl TEMED

Tabelle 2-7: Puffer und Lösungen zur Herstellung eines SSCA Gels

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils zu 8 µl PCR-Produkt, 8 µl Beladungspuffer und 5 µl *aqua bidest.* zusammenpipettiert und 5 Minuten lang bei 95°C denaturiert. Danach wurden die Proben umgehend auf Eis gestellt, um ein Renaturieren der DNA-Einzelstränge zu verhindern. Von jedem Ansatz wurden 8 µl in die entsprechenden Taschen des SSCA-Gels aufgetragen. Auf jedem SSCA Gel wurde eine Wildtyp-Probe als Kontrolle mitgeführt. Die Auftrennung der DNA-Einzelstränge erfolgte unter standardisierten Bedingungen (s. *Tabelle 2-8*) in einer vertikalen Gelelektrophorese Kammer. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE-Puffer verwendet.

Da durch eine Optimierung der Laufbedingungen die Sensitivität der SSCA erhöht werden kann, wurden in Vorversuchen folgende Parameter zur Verbesserung der Bandenschärfe variiert:

- Laufdauer und angelegte Spannung
- Prozentigkeit der Gelmatrix
- Zugabe denaturierender Substanzen wie Formamid und Harnstoff
- Additive wie Polyethylenglykol, Glycerol, Glucose und Sucrose

Es kamen die Bedingungen zur Anwendung, die in den Optimierungsversuchen für das jeweilige PCR-Fragment ein scharfes Bandenmuster ergeben hatten (s. *Tabelle 2-8*). Das Mutationsscreening wurde für jedes PCR-Fragment bei Raumtemperatur und 4°C durchgeführt, um eine maximale Mutationsdetektierbarkeit zu erreichen (s. *Kapitel 4.7*).

Tabelle 2-8: Optimale Bedingungen für das SSCA-Mutationsscreening

PCR-Fragment	Lauf-temperatur	Gelmatrix (%)	Laufzeit (h)	Spannung (V)
SOCS-3 Prom	RT	15	5,0	600
	4°C	15	16,5	400
SOCS-3 3d	RT	15	5,0	600
	4°C	15	16,5	400
SOCS-3 3	RT	15	5,0	600
	4°C	15	16,5	400

Silberfärbung der SSCA-Gele

Die Silberfärbung der PAA-Gele wurde nach einem modifizierten Protokoll von Budowle und Mitarbeitern (1991) durchgeführt und umfasste folgende Schritte: das Gel wurde aus der SSCA-Apparatur entfernt und 5 Minuten in einer Lösung aus 10% Ethanol und 0,5% Eisessig fixiert. Zur Oxidation wurde das Gel für etwa 10 Minuten in 1%iger Salpetersäure geschwenkt und anschließend mit *aqua bidest.* gewaschen. Die Färbung erfolgte für 20 bis

30 Minuten in einer 12 mM Silbernitrat-Lösung, so dass sich die positiv geladenen Silber-Ionen an die DNA anlagern konnten. Das Gel wurde anschließend mit *aqua bidest.* abgespült. Die Reduktion des Silbers erfolgte in einer Entwicklerlösung (280 mM Natriumcarbonat, 0,019 Vol. % Formaldehyd). Nach Sichtbarwerden der Banden wurde die Reaktion durch Zugabe von 10%-iger Essigsäure gestoppt. Anschließend wurde das Gel in 3%igem Glyzerin geschwenkt, um ein Reißen der Gele beim Trocknen zu verhindern. Die SSCA-Gele wurden mit Hilfe eines Vakuum-Geltrockners bei etwa 30° C auf Papier getrocknet.

2.6.2 DNA Sequenzanalyse

Bei der Sequenzierung wird die physikalische Abfolge der vier Nukleotide Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin in der DNA bestimmt. Hier hat sich das Verfahren nach Sanger (1977) durchgesetzt, bei welchem ähnlich wie bei der PCR ein Primer in einer Sequenzier-Reaktion von einer DNA-Polymerase verlängert wird. Im Unterschied zur PCR werden als Bausteine nicht nur Desoxynukleotide (dNTPs) sondern in einem bestimmten molaren Verhältnis zusätzlich bestimmte Didesoxynukleotide (ddNTPs) eingesetzt. Werden diese in einen DNA-Strang eingebaut, kommt es an dieser Stelle zum Kettenabbruch, da eine weitere chemische Verknüpfung mit Nukleotidbausteinen nicht möglich ist. Bei der *dye-terminator* Sequenzierung werden fluoreszenzmarkierte ddNTPs eingesetzt, so dass jede abgebrochene Kette an ihrem Ende ein detektierbares Fluoreszenzmolekül besitzt. Da es statistisch an jeder Stelle zum Abbruch kommen kann, besteht eine Sequenzreaktion aus einer Mischung von unterschiedlich langen Fragmenten, wobei der Fluoreszenzmarker am Ende der Kette Auskunft über die entsprechende Base gibt. Wird diese Mischung in einem elektrophoretischen Verfahren der Größe nach aufgetrennt, entsteht eine „Leiter“ aus DNA-Fragmenten, wobei die „Sprossen“ der Leiter jeweils ein Nukleotid voneinander entfernt sind. Die DNA-Sequenz kann durch die Abfolge der Fluoreszenzmarker in dieser Leiter abgelesen werden und wird üblicherweise in einem Chromatogramm dargestellt.

Mit Hilfe einer Sequenzanalyse wurden die über die SSCA gefunden Sequenzvarianten spezifiziert. Dazu wurden die entsprechenden PCR-Fragmente mit den zugehörigen Primern in ein Speziallabor gesendet (SEQLAB Sequence Laboratories GmbH, Göttingen). Die Sequenzierung der Proben erfolgte bidirektional unter Verwendung der entsprechenden Vor- und Rückwärts Primer. Die Sequenzanalysen wurden mit der Software *Chromas 2.23* (Technelysium Pty. Ltd.) durchgeführt.

2.7 *SNP-Genotypisierung*

2.7.1 Restriktionsfragment Längenpolymorphismus

Restriktionsendonukleasen oder auch Restriktionsenzyme genannt, sind in der Lage, durch Spaltung von Phosphodiesterbindungen die DNA an definierten Positionen zu schneiden. Diese Enzyme erkennen kurze Nukleotidfolgen und spalten die DNA-Stränge entweder direkt an einer solchen Erkennungssequenz oder in einem benachbarten Bereich. Restriktionsenzyme sind bakterieller Herkunft und dienen dort als Schutzmechanismus vor artfremder DNA während die eigene DNA durch Modifikationen der spezifischen Erkennungssequenz vor dem Abbau geschützt ist. Da jedes Restriktionsenzym eine andere Erkennungssequenz besitzt, gibt es oft viele Schnittstellen verschiedener Enzyme in einem DNA-Abschnitt. Falls ein Polymorphismus oder eine Punktmutation eine solche Erkennungssequenz zerstört oder erzeugt, kann dies mit Hilfe des entsprechenden Restriktionsenzyms nachgewiesen werden. Dazu muss allerdings der Basenaustausch und die flankierende Sequenz bekannt sein. Durch Restriktion des DNA-Abschnitts mit dem entsprechenden Enzym und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der Fragmente können die beiden Allele anhand der unterschiedlichen Größe bestimmt werden. Daher wird diese Methode als Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) bezeichnet.

Die RFLP-Methode wurde zur Verifizierung und Genotypisierung von genetischen Varianten eingesetzt. Anhand der in *Kapitel 2.2.3* genannten Internet-Programme wurden geeignete Restriktionsenzyme ausgewählt. Durch eine Sequenzanalyse des PCR-Produktes wurde sichergestellt, dass anhand des Schnittmusters eine eindeutige Zuordnung von Wildtyp bzw. Variante möglich ist. Anschließend wurde ein Restriktionsverdau mit 0,5 Unit (U) Enzym in einem Reaktionsvolumen von 30 µl durchgeführt. Die eingesetzte DNA-Menge betrug etwa 500 ng. Das Reaktionsgemisch wurde gemäß den Herstellerangaben mit dem entsprechenden Puffer bei der geeigneten Reaktionstemperatur für 1 bis 2 Stunden im Schüttelwasserbad inkubiert (s. *Tabelle 2-9*). Im Anschluss an den Verdau erfolgte eine Größenauftrennung der entstandenen DNA-Fragmente auf einem 2,5%igen Agarosegel. Als Testkontrolle wurden DNA-Proben mit bekannten Genotypen verwendet. Von einigen Proben wurde der Genotyp zusätzlich durch Sequenzierung bestätigt.

Tabelle 2-9: Verwendete Restriktionsenzyme für die RFLP-Analyse

Variante	PCR-Produkt (bp)	Restriktionsenzym und Restriktionsbedingungen	wt (bp)	mt (bp)
<i>IRS-1</i> Arg972Gly	221	<i>Bst</i> NI 5' ..CC↓ ^A / _T G..3' 3' ..GG ^A / _T ↑C..5' 2h bei 60°C in 1x SEBuffer 2 ^a	6 215	6 44 171
<i>IRS-2</i> Gly1057Asp	438	<i>Hae</i> II 5' .. ^A / _G GCGC↓ ^C / _T ..3' 3' .. ^C / _T ↑CGCG ^A / _G ..5' 2h bei 37°C in 1x SEBuffer 4 ^b	62 181 195	62 376
<i>SOCS-3</i> -1044C>A	345	<i>Mva</i> I 5' ..CC↓ ^A / _T GG..3' 3' ..GG ^A / _T ↑CC..5' 2h bei 37°C in Buffer R+ ^c	12 158 175	12 333

wt: Schnittmuster für das Wildtyp-Allel; mt: Schnittmuster für die Variante; ^a 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1mM Dithiothreitol, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,9; ^b 50 mM Kaliumacetat, 20 mM Trisacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1mM Dithiothreitol, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,9; ^c 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA, pH 8,5

2.7.2 Allelspezifische PCR

Die allelspezifische PCR oder auch ARMS-PCR (*Amplifikation-Refractory Mutation System*, Newton *et al.* 1989) ist eine einfache und schnelle Methode, um Mutationen die einen Basenaustausch oder kleinere Deletionen betreffen verlässlich zu detektieren. Sie beruht auf der Beobachtung, dass Oligonukleotide, die komplementär zu einer gegebenen DNA-Sequenz sind aber am 3' Ende eine nicht-komplementäre Base aufweisen, die Primeranlagerung und somit die Strangsynthese verhindern. Die allelspezifischen Primer variieren an der letzten Base ihres 3' Endes, die entweder komplementär zur Sequenz des Wildtyps oder der Variante ist. Dadurch wird die DNA in der PCR-Reaktion nur amplifiziert, wenn ein zum Primer komplementäres Allel vorliegt. Zur Verstärkung dieses Effektes wird vor der letzten Base noch eine weitere nicht-komplementäre Base eingefügt.

Die Tetra-ARMS-PCR erfolgt mit einem wildtypspezifischen bzw. mutationsspezifischen Primern (*inner for*), einem gemeinsamen Gegen-Primer (*inner rev*) sowie einem weiteren äußeren Kontroll-Primerpaar (*outer for* / *outer rev*). Durch die allelunabhängige Amplifikation des Kontrollfragmentes wird sichergestellt, dass ein nicht vorhandenes ARMS-PCR Produkt auf die Abwesenheit eines bestimmten Genotyps schließen lässt (s. *Abbildung 2-2*; Ye *et al.* 2001).

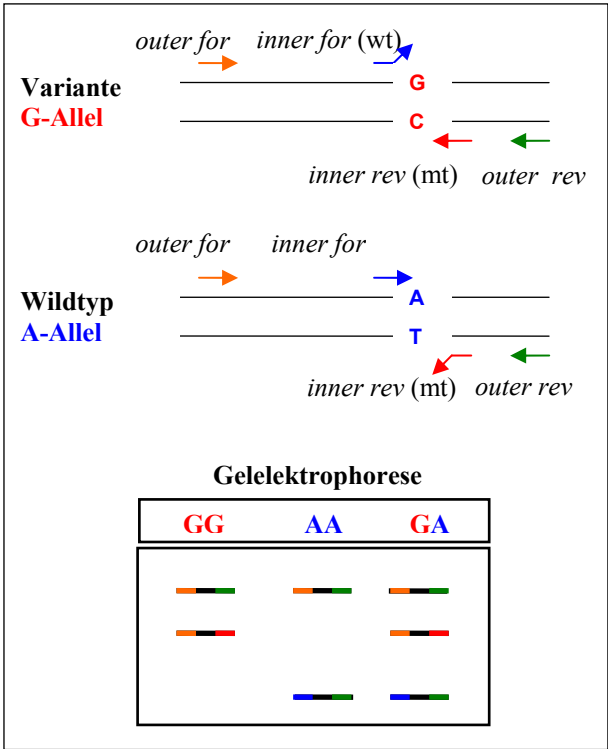


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Tetra-ARMS-PCR. Die 3' terminalen Basen des variantenspezifischen Primers (rot) sind komplementär zum mutierten Allel. Die 3' terminalen Basen des wildtypspezifischen Primers (blau) sind komplementär zum Wildtyp Allel. Ein PCR-Produkt mit dem gemeinsamen Gegenprimer entsteht je nachdem, ob das Wildtyp- oder das mutierte Allel vorliegt. Das äußere Primerpaar (orange und grün) erfolgt die allelunabhängige Amplifikation eines Kontrollproduktes (modifiziert nach Ye *et al.* 2001).

Die Tetra-ARMS-PCR zur Genotypisierung der *SOCS-3* Variante -920C>A wurde unter den in *Tabelle 2-10* angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die Auftrennung der ARMS-PCR-Produkte (10 µl) erfolgte auf einem 2,5%-igem Agarose Gel. Als Testkontrolle wurden DNA-Proben mit bekannten Genotypen mitgeführt. Von einigen Proben wurde der Genotyp zusätzlich durch Sequenzierung bestätigt.

Tabelle 2-10: Verwendete Tetra-ARMS Primer und Amplifikationsbedingungen

Tetra ARMS-Primer (5' → 3') und Produktgrößen	PCR Ansatz	PCR-Reaktion
<i>SOCS-3 -920 inner for</i> CCC GCA CGC AGC CAG CCG TCC <i>SOCS-3 -920 inner rev</i> AGC TGG GCC GGG CGG GCG ACT <i>SOCS-3 -920 outer for</i> CCG CGC TCA GCC TTT CTC TGC TGC GA <i>SOCS-3 -920 outer rev</i> AGT CCA CAA AGG AGC CTT CGC GCG CG	2,5 µl DNA (20 ng/µl) 2,5 µl Puffer (10x) 1,5 µl MgCl ₂ (20 mM) je 0,25 µl PCR-Primer (25 pmol/µl) 0,25 µl dNTP (20 mM/µl) 0,1 µl <i>Taq</i> Pol. (5 U/µl) 25 µl DMSO (5%) ad 25 µl <i>aqua bidest.</i>	5 min. 95°C 30 sek. 95°C 45 sek. 80°C 30 sek. 72°C 5 min. 72°C 35 Zyklen
Wildtyp-spezifisches Primerpaar: <i>SOCS-3 -920 inner for /outer rev</i> (170 bp) Mutanten-spezifisches Primerpaar: <i>SOCS-3 -920 inner rev /outer for</i> (210 bp) Kontroll-Primerpaar: <i>SOCS-3 -920 outer for /outer rev</i> (338 bp)		

2.7.3 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight* Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) ermöglicht, Biomoleküle wie DNA in großen Mengen zu analysieren. Daher wird diese Methode mittlerweile zur *high throughput* Genotypisierung von Sequenzvarianten eingesetzt (Storm *et al.* 2003). Grundlage der SNP-Analyse durch die MALDI-TOF-MS sind Molekulargewichtsbestimmungen. Jeder DNA-Baustein besitzt eine molekulare Masse im Bereich von etwa 300 Dalton (Da) mit jeweils spezifischen Unterschieden. Die zu analysierenden DNA-Moleküle werden durch ein elektrisches Feld auf einen Detektor hin beschleunigt und die Flugzeit (z) als Parameter ihrer Masse (m) bestimmt. Gemäß der Basenzusammensetzung kann somit jeder DNA-Sequenz eine definierte molekulare Masse zugeordnet werden.

Zur SNP-Analyse eines bestimmten DNA-Abschnittes dient das PCR-Fragment als Matrize für eine Primerextensions-Reaktion. Je nach Lage des SNPs werden zur Minimierung unerwünschter Sekundärstrukturen entweder Sinn- oder Gegensinnstrang-Extensionsprimer entworfen, die direkt 5' vor dem zu genotypisierenden Nukleotid enden. In Abhängigkeit vom jeweiligen SNP und den folgenden 3' lokalisierten Nukleotiden werden spezifische dNTPs und ddNTPs eingesetzt, die den Primer allelspezifisch um ein bzw. zwei Nukleotide verlängern. Nach einer Aufreinigung wird das Molekulargewicht der Extensionsprodukte durch die MALDI-TOF-MS bestimmt. Durch die Detektion der allelspezifisch verlängerten Primer kann der Genotyp des untersuchten SNPs eindeutig bestimmt werden (s. *Abbildung 2-3*).

Die Hochdurchsatz SNP-Genotypisierung von Datenbank-SNPs verschiedener Kandidatengene der Leptin-Signalkaskade (s. *Kapitel 3.1.2*) erfolgte in Kooperation mit Herrn Dr. Thomas Bettecken am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Thomas Meitinger. Die Primer-Extensionsreaktion und die anschließende MALDI-TOF MS-Analyse wurde entsprechend des Hersteller-Protokolls (hMETM Sequenom USA) durchgeführt.

Wildtyp

5' -AGAGCAGATCCCTGGACAGGAGAGGAATACAGA- 3'
 3' -TCTCGTCTAGGGACCTGTCCTCTCCTTATGTCT- 5'

Variante

5' -AGAGCAGATCCCTGGACAGGA~~A~~AGGAATACAGA- 3'
 3' -TCTCGTCTAGGGACCTGTCCT~~T~~TCCTTATGTCT- 5'

Extensionsprimer

CAGATCCCTGGACAGGA 5181 Da

Reaktion mit dGTP und ddATP:**Extensionsprodukt Wildtyp:**

CAGATCCCTGGACAGGAGA 5807 Da

Extensionsprodukt Variante:

CAGATCCCTGGACAGGA~~A~~ 5478 Da

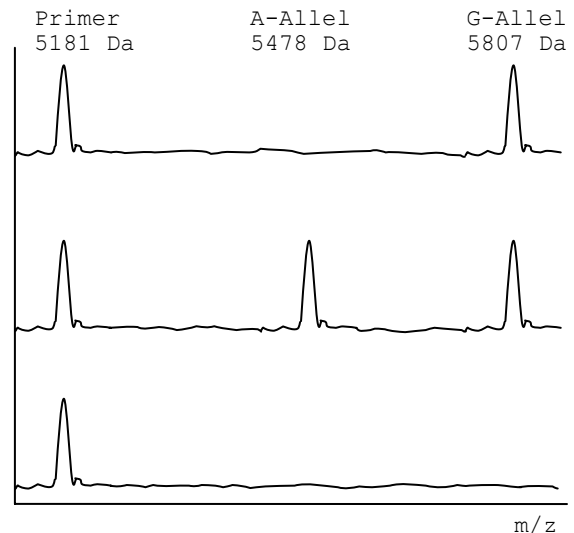


Abbildung 2-3: Konzeption der Primer-Extensionsreaktion und Analyse der Extensionsprodukte im Massenspektrometer. Der Extensionsprimer endet direkt 5' vor dem zu genotypisierenden Nukleotid. Links: durch Zugabe spezifischer dNTPs und ddNTPs wird der Primer allelspezifisch um ein oder zwei Nukleotide verlängert. Rechts: die massenspektrometrische Analyse detektiert das Molekulargewicht der Extensionsprodukte.

2.8 Validierung der Genotypen und Datenverwaltung

Bei der Auswertung der Genotypisierungsdaten wurden alle drei möglichen Genotypen (homozygot für Allel 1, heterozygot und homozygot für Allel 2) berücksichtigt. Das prozentual häufiger vorkommende Allel wurde als Allel 1, das seltenere als Allel 2 definiert. Sämtliche Proben wurden doppelt und unabhängig ausgewertet, die Auswertungen verglichen und bei Unklarheiten gegebenenfalls erneut genotypisiert. Das Datenmaterial wurde in Tabellen (Microsoft[®] Access 2002) importiert und verwaltet.

2.9 Statistische Methoden

Ein statistischer Test liefert nach bestimmten Regeln eine Entscheidung darüber, ob eine vorgegebene Hypothese über die zu untersuchende Grundgesamtheit anhand von Daten aus einer Stichprobe akzeptiert oder verworfen wird. In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob bestimmte Markerallele überzufällig häufig mit dem Phänotyp Adipositas auftreten. Unter dieser Fragestellung postuliert die Nullhypothese H_0 , dass die Verteilung der Allele unabhängig vom Phänotyp ist ($p_1 = p_2$), während die Alternativhypothese H_1 annimmt, dass die Allelverteilung vom Phänotyp abhängig ist ($p_1 \neq p_2$), also eine Assoziation vorliegt. Die Häufigkeiten p_1 und p_2 stehen für Anteile der Grundgesamtheiten

mit einer bestimmten Ausprägung des Phänotyps. Im vorliegenden Fall sind dies untergewichtige Kontrollpersonen (p_1) und extrem adipöse Kinder und Jugendliche (p_2). Da ausschließlich explorative Untersuchungen durchgeführt wurden, waren weder die Allelverteilung noch ein genetisches Modell vorhanden. Infolgedessen erfolgte die Formulierung der Alternativhypothese zweiseitig, da die Fehlerrichtung der Häufigkeitsschätzer p_1 und p_2 nicht bekannt war ($p_1 < p_2$ oder $p_1 > p_2$). Nach einer initialen Assoziationsstudie bzw. bei Vorliegen von Kenntnissen zur Häufigkeitsverteilung, wurden zur Bestätigung der Befunde unabhängige Populationen untersucht, bei denen dann die Alternativhypothese einseitig formuliert werden konnte.

Es gibt eine Reihe von Methoden, mit denen auf Assoziation getestet werden kann. Die Verfahren, die in der vorliegenden Arbeit angewendet wurden, werden nachfolgend dargestellt.

2.9.1 Fall-Kontroll Assoziationstests

Der klassische Ansatz zur Untersuchung einer Assoziation ist der Fall-Kontroll Assoziationstest. Hierbei werden innerhalb einer Stichprobe die Häufigkeiten eines Markerallels bei Merkmalsträgern und nicht betroffenen Personen verglichen. Da hierfür keine Modellannahme des Erbganges gemacht werden muss, können nicht-parametrische Tests, die zwei unabhängige relative Häufigkeiten vergleichen, angewandt werden. Abhängig vom Studienumfang gibt es zwei wesentliche Verfahrenstypen: die exakten Testverfahren, die bei kleinen Studien durchgeführt werden und der asymptotische *Chi-Quadrat* (χ^2)-Test, der bei hinreichend großen Fallzahlen möglich ist.

Der χ^2 -Test prüft die Unabhängigkeit zweier Merkmale, die durch alternative Merkmalsausprägungen gekennzeichnet sind. Dazu werden die festgestellten Häufigkeiten in den Stichproben in Form einer Vierfeldertafel, der so genannten Kontingenztafel, dargestellt (s. *Tabelle 2-11*). Für jedes der vier Felder wird die Differenz aus beobachteten und erwarteten Häufigkeiten gebildet, quadriert und durch die erwartete Häufigkeit geteilt. Der χ^2 -Wert wird dann durch die Summe der entsprechenden Werte für alle vier Zellen gebildet.

Der Index i bedeutet, dass für jede der aufgestellten Tafeln der hinter dem Summenzeichen stehende Ausdruck zu berechnen und dann in der Summe zusammenzufassen ist.

Die für die vorliegende Arbeit durchgeführten χ^2 -Tests wurden mit Hilfe der Computer-Software *SAS* (Version 8.02, SAS Institute Inc.) berechnet. Da bei Assoziationsstudien für jeden durchgeführten Test ein eigenes Risiko für ein falsch positives Ergebnis besteht, ist eine Korrektur notwendig, sofern ein Genort auf verschiedene Fragestellungen hin getestet wird (Shaffer 1995). Ein solches Verfahren ist die *Bonferroni-Korrektur für multiples Testen*. Hierbei wird das Signifikanzniveau nicht wie üblich bei $p = 0,05$ festgelegt sondern bei $p = \frac{0,05}{n}$, wobei n die Zahl der möglichen unabhängigen Assoziationen ist, die geprüft

werden. Der korrigierte p -Wert berechnet sich also nach der Formel: $p = \frac{\alpha}{n}$

Alle in der vorliegenden Arbeit errechneten p -Werte sind nominale Werte, die nicht nach Bonferroni korrigiert wurden und daher nur explorativen Charakter haben.

2.9.2 Test auf Transmissions-Ungleichgewicht

Der Test auf Transmissions-Ungleichgewicht (*Transmission-Disequilibrium Test*, TDT, Spielman *et al.* 1993) vergleicht wie eine Assoziationsstudie, ob ein spezifisches Allel überzufällig häufig bei betroffenen Personen auftritt. Allerdings wird dies nicht bei voneinander unabhängigen Personen untersucht sondern innerhalb von Familien. Hierfür werden üblicherweise das betroffene Kind sowie beide Elternteile in das Testverfahren eingeschlossen (*Trio Design*, Bøddeker und Ziegler 2000). Es werden Allele der Eltern, die an die betroffenen Kinder transmittiert werden als Fälle betrachtet (Kopplungsinformation), während die nicht-transmittierten Allele als fiktive interne Kontrollallele (Assoziationsinformation) dienen (s. *Abbildung 2-4*).

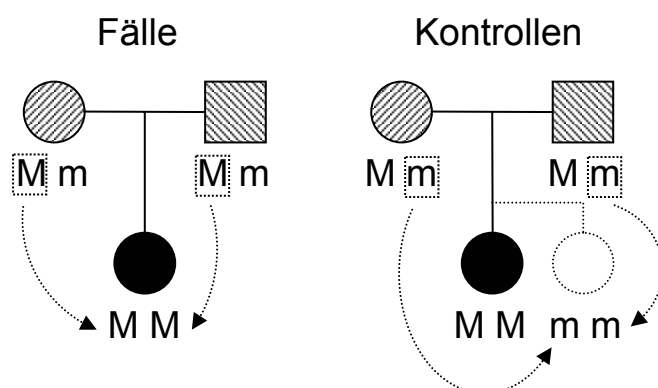


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung einer TDT-Analyse. Die an das Kind transmittierten Allele MM dienen als Fälle. Die nicht an das Kind transmittierten elterlichen Allele mm als Allele einer fiktiven Kontrollperson. Wie aus der Abbildung hervorgeht, liefern nur heterozygote Eltern Segregationsinformationen und gehen in die Berechnungen ein (modifiziert nach Bøddeker und Ziegler 2000).

Dabei ist nicht relevant, ob das jeweilige Elternteil betroffen ist oder nicht. Jedoch liefern nur heterozygote Eltern Segregationsinformationen und gehen in die Berechnungen ein. Aufgrund der Kombination aus Kopplungs- und Assoziations-Test kann eine Assoziation nur entdeckt werden, wenn gleichzeitig Kopplung vorliegt und umgekehrt (Ewens und Spielman 1995).

Durch die Verwendung fiktiver interner Kontrollallele sind Scheinassoziationen, wie sie in typischen Fall-Kontroll Studien durch Populationsstratifikationen entstehen können, ausgeschlossen. Daher wurde der TDT in der vorliegenden Arbeit zur Bestätigung von positiven Assoziationsbefunden durchgeführt. Hierzu wurden die entsprechenden Sequenzvarianten in unabhängigen Familien mit einem betroffenen Kind (Trios) genotypisiert und die beobachteten Allelverteilungen in eine Vierfeldertafel nach Ott (1989) eingetragen (s. *Tabelle 2-12*).

<i>nicht-transmittiert</i>	<i>transmittiert</i>	
	Allel M	Allel m
Allel M	a	b
Allel m	c	d

Tabelle 2-12: Schema einer Vierfeldertafel für den TDT. In die entsprechenden Felder werden die Häufigkeiten der transmittierten und nicht-transmittierten elterlichen Allele eingetragen.

Hat ein Allel keinen Einfluss auf den Phänotyp (Nullhypothese) werden die beiden Allele M und m gleich häufig weitergegeben, d.h. die Transmissionsrate beträgt 50%. Liegt zwischen Marker und Krankheits-Allel Kopplung bzw. Assoziation vor (Alternativhypothese), so sind b und c unterschiedlich groß. Dabei stellt b die Häufigkeit der transmittierten (vermutlich mit dem Krankheits-Allel gekoppelten) M-Allele und c die Häufigkeit der transmittierten (vermutlich nicht mit dem Krankheits-Allel gekoppelten) m-Allele dar.

Zur Berechnung eines Transmissionsungleichgewichtes wurde die von Terwilliger und Ott (1992) vorgeschlagene Teststatistik nach *McNemar* durchgeführt: $\chi^2 = \frac{(b - c)^2}{(b + c)}$

Die Alternativhypothese wird erst angenommen wenn zwischen Krankheitsgen und Markerloкус Kopplung und Assoziation bestehen, d.h. wenn das Testergebnis signifikant von der χ^2 -Verteilung abweicht (üblicherweise p -Werte kleiner 0,05). Eine Scheinassoziation reicht in Abwesenheit von Kopplung daher nicht aus. Der TDT wurde mittels der Computer-Software *Genehunter* (Version 1.3) berechnet. Vor den

Berechnungen wurden alle Genotypen mit der Computer-Software *PedCheck* (Version 1.1; O'Connell und Weeks 1998) auf Mendel'schen Erbgang geprüft.

Martin und Mitarbeiter (1997) haben den TDT derart modifiziert, dass er auch bei Verwendung von Familien mit mehreren betroffenen Kindern ein gültiger Test auf Assoziation bleibt. Der *Pedigree Transmission-Disequilibrium-Test* (PDT; Martin *et al.* 2000) korrigiert für Abhängigkeiten zwischen den untersuchten Individuen und wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, wenn erweiterten Familienstrukturen vorlagen (Quartette, Quintette usw.). Zur Berechnung des PDT wurde die von Martin und Mitarbeitern (2000) zur Verfügung gestellte Computer-Software herangezogen (URL <http://wwwchg.mc.duke.edu>).

2.9.3 Statistische Teststärke

Die aufgestellten Hypothesen können durch einen statistischen Test nie letztendlich verifiziert oder falsifiziert werden. Die Annahme einer Hypothese sagt lediglich aus, dass die vorliegende statistische Evidenz nicht ausreicht, um die Hypothese zu verwerfen. Für die richtige bzw. falsche Schlussfolgerung eines Tests gilt die in *Tabelle 2-13* aufgeführte Fehlersystematik. Hiernach beschreibt die Teststärke oder *Power* die Aussagekraft eines statistischen Tests. Sie gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Signifikanztest zugunsten der Alternativhypothese entscheidet, falls diese richtig ist.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Stichprobenzahl erreicht bei einer angenommenen Frequenz des seltenen Allels von über 0,05 und gegebenem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ eine *Power* von über 80% zur Detektion eines multiplikativen relativen Risikos von etwa 2,0 (*Power* calculation software QUANTO Version 1.0, URL <http://hydra.usc.edu/gxe>; Gauderman 2003). Diese Teststärke ist ausreichend, um Varianten mit moderatem Effekt auf den Phänotyp zu detektieren.

Tabelle 2-13: Fehlersystematik im statistischen Test

Schlussfolgerung des Tests	Unbekannte Wirklichkeit	
	H₀ trifft zu	H₁ trifft zu
H₀ Annahme	1- α (richtige Schlussfolgerung)	β (Fehler 2. Art)
H₀ Ablehnung	α (Fehler 1. Art)	1- β (<i>Power</i>) (richtige Entscheidung)

2.9.4 Hardy-Weinberg Gleichgewicht

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) beschreibt Genotyphäufigkeiten anhand von Anteilen der verschiedenen Allele eines Gens in einer Population. Wenn für einen bestimmten Genlocus in einer Population zwei Allele A und a bekannt sind, die mit einer bestimmten Frequenz vorkommen, stellt sich eine konstante Allelhäufigkeit ein. Kommt Allel A mit einer Genfrequenz von p und Allel a mit einer Genfrequenz von q vor, beträgt die statistische Wahrscheinlichkeit für das Zusammentreffen zweier A Allele p^2 und für das Zusammentreffen zweier a Allele q^2 . Die Wahrscheinlichkeit für das Zusammentreffen des Allels A und mit dem Allel a beträgt $2pq$. Da nur die zwei Allele vorkommen, beträgt die Summe von p und q eins: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$.

Das Vorhandensein eines HWG ist eines der wichtigsten Parameter populationsgenetischer Datensätze. Mit der Formel nach Hardy und Weinberg lassen sich anhand einer experimentell bestimmten Allelfrequenz die Häufigkeiten aller drei möglichen Genotypen in einer Population berechnen. Die berechneten Genotypfrequenzen sollten mit den experimentell gefundenen Häufigkeiten übereinstimmen. Da für die Berechnungen ein künstliches und stark einschränkendes Populationsmodell zugrunde gelegt wird, können Abweichungen vom HWG durch nicht-zufällige Paarung der Allele, beispielsweise infolge Inzucht, Selektion oder genetischer Drift, entstehen. Eine Abweichung vom HWG kann aber auch ein Hinweis auf grobe systematische Fehler beispielsweise bei der Genotypisierung sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Genotypisierungsdaten anhand der Computer Software *PEDSTATS* (Version 0.6.4; Wigginton *et al.* 2005) auf das Vorliegen eines HWG getestet. Die ermittelten Genotypverteilungen zeigten in keinem Fall eine Abweichung vom HWG (alle p -Werte lagen über 0,5; s. Kapitel 3.5).

3 Ergebnisse

3.1 *in silico* Analyse der Kandidatengene

Nachfolgend werden die Befunde der *in silico* Analyse der ausgewählten Kandidatengene dargestellt. Die Daten und Informationen repräsentieren den Wissensstand zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit.

3.1.1 Genstruktur und bekannte SNPs in *SOCS-3*, *IRS-1* und *IRS-2*

Zu Beginn einer eingehenden Untersuchung der Kandidatengene erfolgte die Aufklärung von chromosomaler Lage, Struktur und bekannter SNPs der betreffenden Gene anhand der in genomischen Datenbanken sowie in der Literatur verfügbaren Informationen (s. *Kapitel 2.2*).

Suppressor of Cytokine Signaling-3

Das humane *SOCS-3* Gen ist auf Chromosom 17q25.3 lokalisiert und besteht aus einem Exon von 675 bp Größe (Masuhara *et al.* 1997). Mit Hilfe der in *Kapitel 2.2* angegebenen Datenbanken wurde der Genlocus von *SOCS-3* (17q25.3) nach Kopplungsbefunden mit Adipositas und assoziierten Phänotypen untersucht. Die Recherchen ergaben, dass für den Marker D17S784 mit der chromosomalen Lokalisation 17q25.3 von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen positive Kopplungsbefunde mit Adipositas-assoziierten Phänotypen publiziert wurden (s. *Tabelle 3-1*; Norman *et al.* 1997; Lindsay *et al.* 2001).

Tabelle 3-1: Kopplungsbefunde von DNA-Markern im Bereich des *SOCS-3* Locus mit Adipositas-assoziierten Phänotypen

DNA-Marker	Chrom. Lokalisation	untersuchtes Kollektiv	LOD-score/ <i>p</i> -Wert	Phänotyp
D17S784	17q25.3	283 Personen mit Adipositas und IDDM (88 Familien) ^a	LOD 0,9 <i>p</i> = 0,046	Körperfett in Prozent
		1338 Personen mit NIDDM (332 Familien) ^b	LOD 1,6 (paternal)	BMI
D17S785	17q25.1	283 Personen mit Adipositas und IDDM (127 Familien) ^c	LOD 2,4	Körperfett in Prozent
D17S1301	17q25.2	521 Personen (156 Familien) mit NIDDM ^d	LOD 2,2	abdominales Subkutanfett
		256 Personen (164 Familien) mit NIDDM ^e	LOD 1,41 <i>p</i> = 0,005	BMI

^a Norman *et al.* 1997; ^b Lindsay *et al.* 2001; ^c Norman *et al.* 1998; ^d Pérusse *et al.* 2001; ^e Iwasaki *et al.* 2003. IDDM: insulinabhängiger Diabetes mellitus; NIDDM: nicht insulinabhängiger Diabetes mellitus

Die 5' untranslatierte Region (*Untranslated Region*, UTR) von *SOCS-3* umfasst etwa 1,1 kb strangaufwärts vom Translationsstart (ATG) und weist einen Guanin/Cytosin-(G/C-) Gehalt von etwa 74% auf (He *et al.* 2003). Innerhalb dieser Region konnte ein Bereich von 128 bp identifiziert werden, der für eine maximale Genexpression essentiell ist. Dieser Minimalpromoter enthält zwei Bindedomänen für STAT3 Transkriptionsfaktoren (*STAT3 Binding Element*, SBE), ein G/C-reiches Element und eine TATA-Box (He *et al.* 2003).

Für das *SOCS-3* Mutationsscreening wurden nach den in *Kapitel 2.2.3* aufgeführten Kriterien PCR-Primer gewählt, die den codierenden Bereich des Gens sowie den Minimalpromoter flankieren (s. *Abbildung 3-1*). Die SSCA-Analyse der PCR-Produkte diente der Suche nach Sequenzvariationen in den amplifizierten Bereichen. Die identifizierten Sequenzvarianten wurden als Marker für Assoziationsanalysen bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie untergewichtigen Kontrollpersonen herangezogen. In *Abbildung 3-1* sind die zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit in den frei zugänglichen Datenbanken verzeichneten SNPs dargestellt.

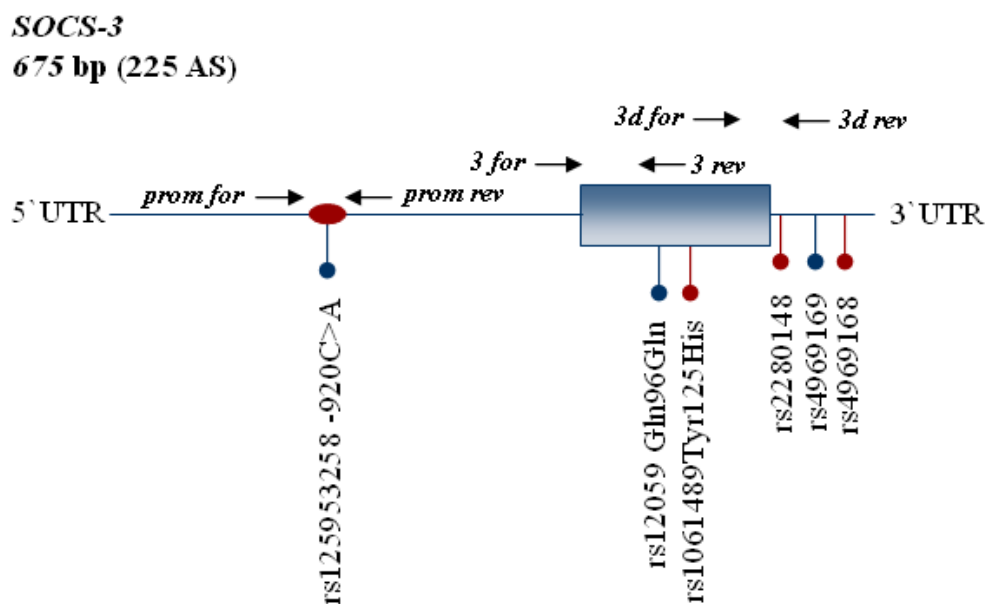


Abbildung 3-1: *SOCS-3* Genstruktur, Datenbank-SNPs und Primerpositionen zur Amplifikation der codierenden Region und des Minimalpromoters. Rot: validierte SNPs, blau: nicht-validierte SNPs, oval: Minimalpromoter, Pfeile: Lage der Primer (NCBI, Stand: August 2005).

Insulin Rezeptor Substrate-1 und -2

Das humane *IRS-1* Gen wurde auf Chromosom 2q36.3 lokalisiert und besteht aus einem Exon mit 3729 bp (Sun *et al.* 1991). Zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit waren in den frei verfügbaren Datenbanken die in *Abbildung 3-2* dargestellten SNPs in der codierenden

Region von *IRS-1* verzeichnet. Der SNP Arg972Gly (rs1801278) stellte sich aufgrund der aktuellen Literatur als relevant im Zusammenhang mit Adipositas heraus (s. *Kapitel 4.3.1*). Daher wurden nach den in *Kapitel 2.2.3* aufgeführten Kriterien PCR-Primer gewählt, die den SNP Arg972Gly flankieren. Zuvor wurde durch eine *in silico* Analyse des amplifizierten DNA-Bereiches sichergestellt, dass eine Unterscheidung der Allele durch die RFLP-Methode möglich ist (s. *Kapitel 2.7.1*).

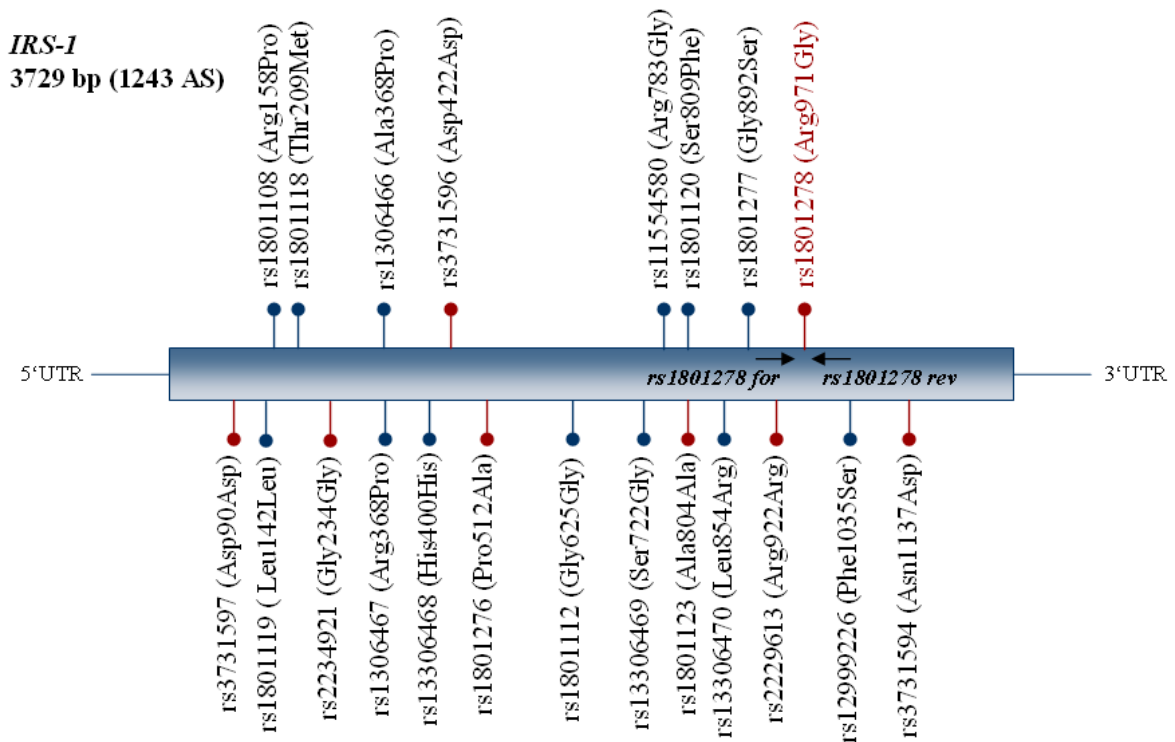


Abbildung 3-2: IRS-1 Genstruktur, Datenbank-SNPs und Primerpositionen zur Amplifikation des Genbereiches, der den SNP rs1801278 (Arg972Gly) flankiert. Rot: validierte SNPs, blau: nicht-validierte SNPs, Pfeile: Lage der Primer. Es wurden nur SNPs in der codierenden Region berücksichtigt (NCBI, Stand: August 2005).

Das humane *IRS-2* Gen wurde auf Chromosom 13q33.3 lokalisiert und besteht aus einem Exon mit 4014 bp (Sun *et al.* 1995). Zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit waren in den frei verfügbaren Datenbanken die in *Abbildung 3-3* dargestellten SNPs in der codierenden Region von *IRS-2* verzeichnet. Der SNP Gly1057Asp (rs1805097) stellte sich aufgrund der aktuellen Literatur als relevant im Zusammenhang mit Adipositas heraus (s. *Kapitel 4.3.1*). Daher wurden nach den in *Kapitel 2.2.3* aufgeführten Kriterien PCR-Primer gewählt, die den SNP Gly1057Asp flankieren. Zuvor wurde durch eine *in silico* Analyse des amplifizierten DNA-Bereiches sichergestellt, dass eine Unterscheidung der Allele durch die RFLP-Methode möglich ist (s. *Kapitel 2.7.1*).

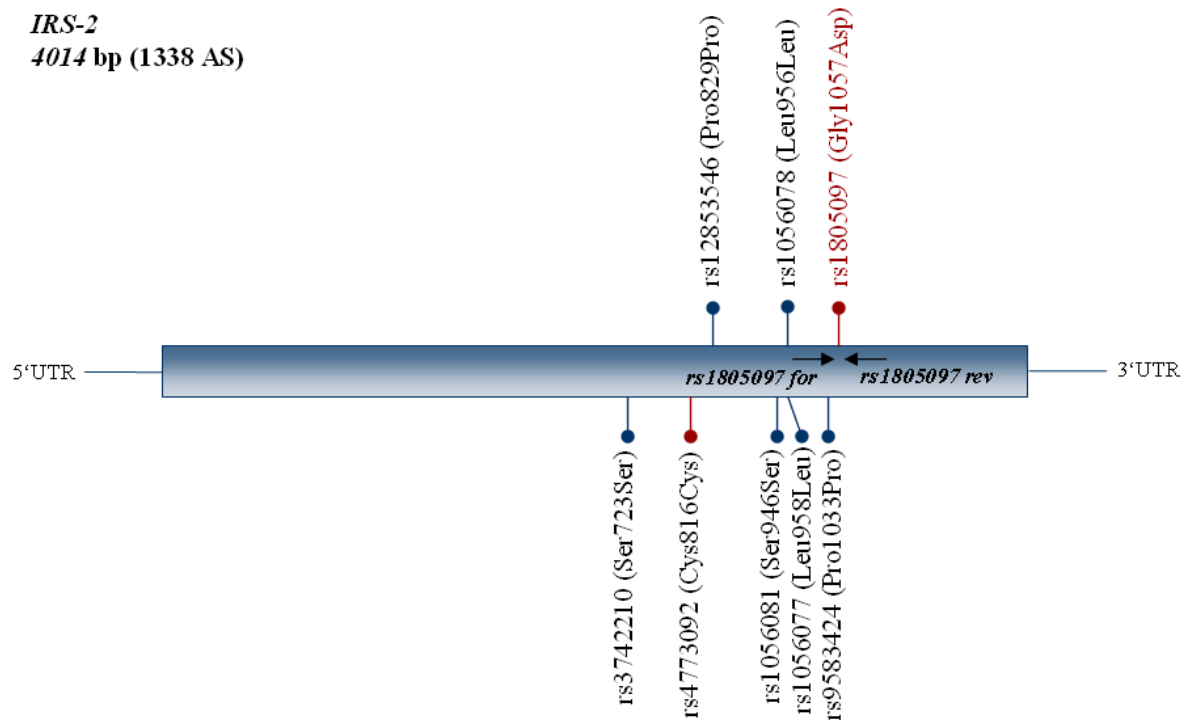


Abbildung 3-3: IRS-2 Genstruktur, Datenbank-SNPs und Primerpositionen zur Amplifikation des Genbereiches, der den SNP rs1805097 (Gly1057Asp) flankiert. Rot: validierte SNPs, blau: nicht-validierte SNPs, Pfeile: Lage der Primer. Es wurden nur SNPs in der codierenden Region berücksichtigt (NCBI, Stand: August 2005).

3.1.2 Kandidatengene für die SNP-Analyse

Ausgehend von Datenbankinformationen und aktueller Literatur wurden insgesamt 20 Gene mit nachgewiesener oder mutmaßlicher Funktion bei der Übermittlung bzw. Regulation des Leptin-Signals ausgewählt. Nach den in *Kapitel 2.2.2* aufgeführten Bedingungen wurden in den entsprechenden Genen insgesamt 29 Datenbank-SNPs zur weiteren Analyse ausgewählt (s. *Tabelle 3-2*).

Tabelle 3-2: Ausgewählte Datenbank-SNPs in Genen der Leptin-Signalkaskade

Gen/ Abkürzung	SNP	Position	Allel-frequenzen	Heterozygoten-frequenz
<i>Signal Transducers and Activators of Transcription-3 (STAT3)</i>	rs2293152	Intron	G/ C (0,64/ 0,36)	0,461
	rs2306581	Intron	C/ A (0,58/ 0,42)	0,487
	rs744166	UTR	T/ A (0,57/ 0,43)	0,490

-Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt-

-Fortsetzung von Tabelle 3-2-

Gen/ Abkürzung	SNP	Position	Allel-frequenzen	Heterozygoten-frequenz
<i>Signal Transducers and Activators of Transcription-5A (STAT5A)</i>	rs2272087	Intron	T/ C (0,65/ 0,35)	0,458
<i>Tyrosin Kinase 2 (TYK2)</i>	rs280519	Intron	C/ T (0,83/ 0,17)	0,282
	rs280496	Intron	G/ A (0,55/ 0,45)	0,495
<i>Janus Kinase 2 (Jak2)</i>	rs2274472	UTR	A/ G (0,56/ 0,44)	0,493
<i>Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)</i>	rs718206	Intron	A/ T (0,79/ 0,21)	0,332
	rs742824	Intron	A/ G (0,80/ 0,20)	0,320
<i>Adenosinmonophosphate-activated Protein Kinase (AMPK)</i>	rs1124900	Intron	T/ G (0,63/ 0,38)	0,459
	rs1418442	Intron	A/ G (0,77/ 0,23)	0,358
<i>v-fos FBJ murine Osteosarcoma viral Oncogene Homolog (FOS)</i>	rs1046117	CDS	C/ T (0,54/ 0,46)	0,497
	rs1063169	Intron	G/ T (0,75/ 0,25)	0,375
<i>Mitogen-activated Protein Kinase-1 (MAPK1)</i>	rs2266965	UTR	A/ G (0,53/ 0,47)	0,498
	rs2283794	Intron	T/ C (0,57/ 0,43)	0,490
<i>Mitogen-activated Protein Kinase-8 (MAPK8)</i>	rs2289805	Intron	G/ T (0,67/ 0,33)	0,445
<i>Casein Kinase-2A1 (CSNK2A1)</i>	rs459710	UTR	C/ T (0,77/ 0,23)	0,356
	rs157816	Intron	C/ T (0,55/ 0,45)	0,495
<i>Ephrin Rezeptor B2 (EPHB2)</i>	rs309485	Intron	C/ G (0,59/ 0,41)	0,483
	rs116119	Intron	T/ C (0,65/ 0,35)	0,455
<i>Growth Factor Receptor-bound protein 2 (GRB2)</i>	rs1076094	Intron	C/ T (0,63/ 0,37)	0,466
<i>Protein-Tyrosine Phosphatase Nonreceptor Type 11 (PTPN11)</i>	rs2301756	Intron	C/ T (0,80/ 0,20)	0,318
<i>Raf Proto-oncogene 1 (RAF1)</i>	rs1039244	Intron	G/ C (0,70/ 0,30)	0,420
<i>Solute Carrier Family 2 (SLC2A4)</i>	rs5435	CDS	C/ T (0,55/ 0,45)	0,495
<i>Protein Inhibitor of Activated STAT (PIAS1)</i>	rs1489595	Intron	T/ C (0,89/ 0,11)	0,196
<i>Protein Tyrosin Phosphatase 1B (PTP1B)</i>	rs6020571	Promoter	A/G *	*
<i>Protein Kinase C α (PRKCA)</i>	rs721429	Intron	C/ T (0,57/ 0,43)	0,489
<i>Protein Tyrosine Kinase 2 (PTK2)</i>	rs306957	UTR	G/ A (0,51/ 0,49)	0,500
<i>Protein Tyrosine Kinase 2B (PTK2B)</i>	rs956152	UTR	G/ A (0,82/ 0,18)	0,295

Quelle: Datenbankeinträge des NCBI, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>, Stand: August 2005;
 *unvalidierter Datenbank-SNP, CDS: kodierende Sequenz, UTR: untranslatierte Region

3.2 Mutationsdetektion im *SOCS-3* Gen

Für das Mutationsscreening der codierenden Sequenz (*Coding Sequence*, CDS) sowie des Minimalpromoters von *SOCS-3* wurde die Methode der Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCA; s. Kapitel 2.6.1) angewendet. Das initiale Mutationsscreening umfasste 186 extrem adipöse Kinder und Jugendliche sowie 188 untergewichtigen Kontrollpersonen. Dieses Kollektiv stellte eine Untergruppe der in *Tabelle 2-1* aufgeführten Studiengruppen dar. Proben, die ein abweichendes Bandenmuster in der SSCA aufwiesen, wurden sequenziert und die identifizierten Sequenzvarianten mit Hilfe der PCR-RFLP bestätigt (s. Kapitel 3.2).

In den PCR-Fragmenten, welche die codierende Sequenz von *SOCS-3* umfassten (*SOCS-3 3* und *SOCS-3 3d*), konnten keine Sequenzvarianten nachgewiesen werden. Dagegen konnten im PCR-Fragment *SOCS-3 prom*, welches den Minimalpromoter sowie die flankierende Sequenz beinhaltete, insgesamt vier Sequenzvarianten identifiziert werden (s. *Abbildung 3-4*). Die seltenen Varianten -1037T>C und -985G>T konnten nur bei einem bzw. drei Probanden identifiziert werden. Die SNPs -1044C>A und -920C>A fanden sich bei insgesamt 11 bzw. 49 Probanden und wurden für weitere Untersuchungen herangezogen.

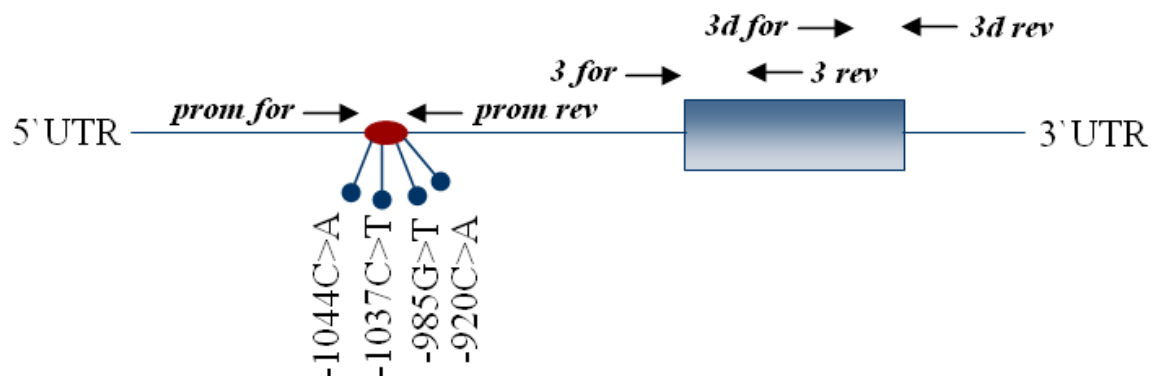


Abbildung 3-4: Überblick über die im Mutationsscreening identifizierten Sequenzvarianten in *SOCS-3*. Die Pfeile markieren die Primerpositionen. Der Minimalpromoter ist oval dargestellt (NCBI Datenbankeintrag NC_000017; Stand: August 2005).

3.2.1 Identifizierte Sequenzvarianten im *SOCS-3* Promoterbereich

SOCS-3 -1044C>A

Die SSCA-Analyse des 345 bp PCR-Fragmentes *SOCS-3 prom* ergab ein aberrantes Bandenmuster, das auf eine Veränderung der Nukleotidsequenz hindeutet. Sowohl bei

einer Lauftemperatur von 4°C als auch bei Raumtemperatur war im Vergleich zu den Wildtyp-Proben eine zusätzliche Bande erkennbar (s. *Abbildung 3-5*).

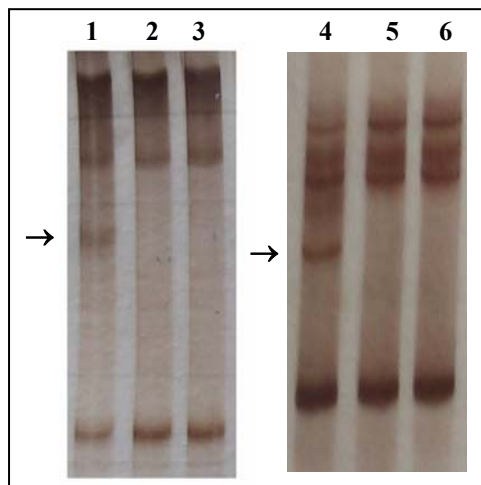


Abbildung 3-5: Ausschnitt aus SSCA-Gelen mit der Variante -1044C>A in SOCS-3. Ein Nachweis der Variante ist bei beiden Lauftemperaturen möglich (links: 4°C, rechts: Raumtemperatur). Die zusätzliche Bande in Spur 1 bzw. Spur 4 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Um die Sequenzveränderung zu spezifizieren, wurden die Proben mit der entsprechenden Auffälligkeit sequenziert. Die Sequenzanalyse zeigte hier im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz einen Nukleotidaustausch von Cytosin zu Adenin an Position -1044 im *SOCS-3* Promoter (s. *Abbildung 3-6*). Die *in silico* Analyse der veränderten DNA-Sequenz ergab, dass die Basenveränderung die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *MvaI* (5'...CC/^ATG...3') zerstört. Dadurch war es möglich, die Allele anhand der PCR-RFLP zu identifizieren (s. *Abbildung 3-13*).

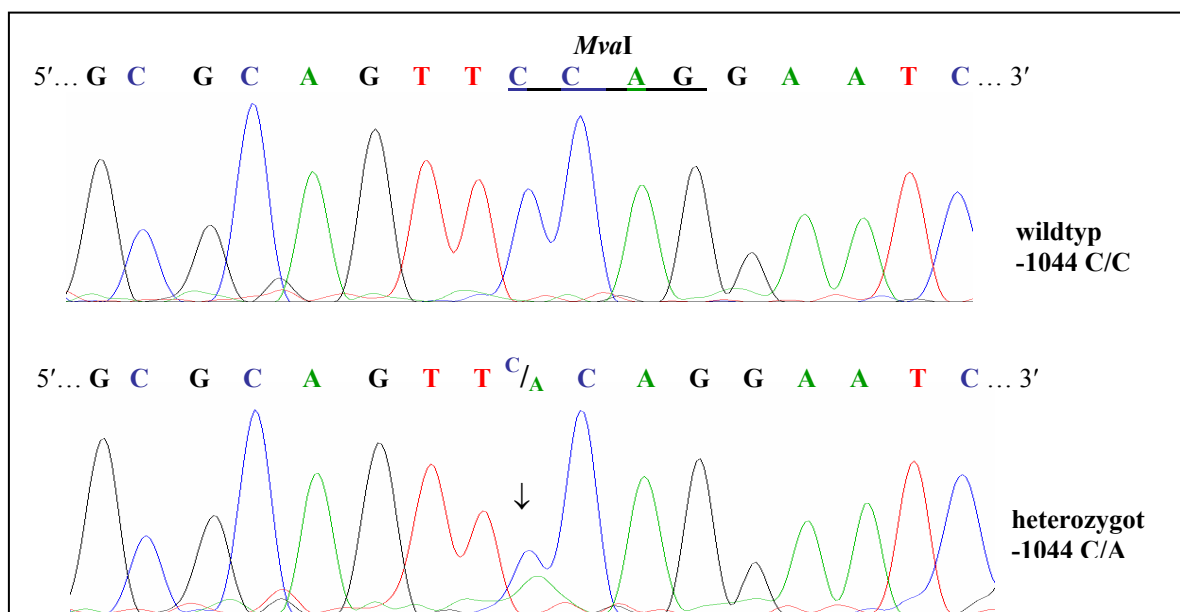


Abbildung 3-6: Sequenzanalyse der Variante -1044C>A in SOCS-3. Der Ausschnitt zeigt die Nukleotidpositionen -1052 bis -1036. Oben: Wildtyp Sequenz. Unten: Sequenz der heterozygoten Variante. Durch den Basenaustausch C>A an Position -1044 (s. Pfeil) wird die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *MvaI* (unterstrichen) zerstört.

SOCS-3 -920C>A

Bei der SSCA-Analyse von *SOCS-3 prom* konnte ein weiteres aberrantes Bandenmuster identifiziert werden. Sowohl bei einer Lauftemperatur von 4°C als auch bei Raumtemperatur war eine zusätzliche Bande erkennbar, die sich bei den Wildtyp-Proben nicht zeigte (s. *Abbildung 3-7*).

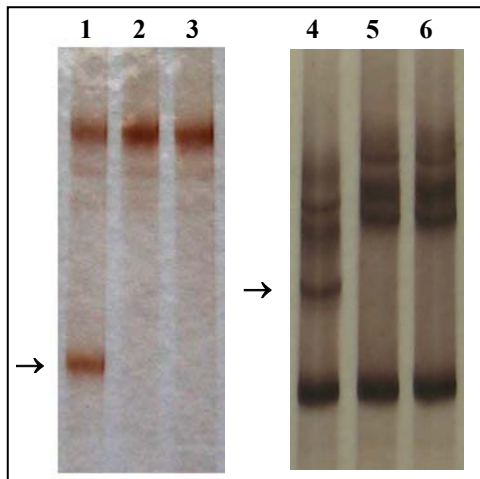


Abbildung 3-7: Ausschnitt aus SSCA-Gelen mit der Variante -920C>A in SOCS-3. Ein Nachweis der Variante ist bei beiden Lauftemperaturen (links: 4°C, rechts: Raumtemperatur) möglich. Die zusätzliche Bande in Spur 1 bzw. Spur 4 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Um die Sequenzveränderung in diesen Proben zu spezifizieren, wurden Proben mit der entsprechenden Auffälligkeit sequenziert. Die Sequenzanalyse zeigte bei diesen Proben im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz einen Nukleotidaustausch von Cytosin zu Adenin an Position -920 des *SOCS-3* Gens (s. *Abbildung 3-8*).

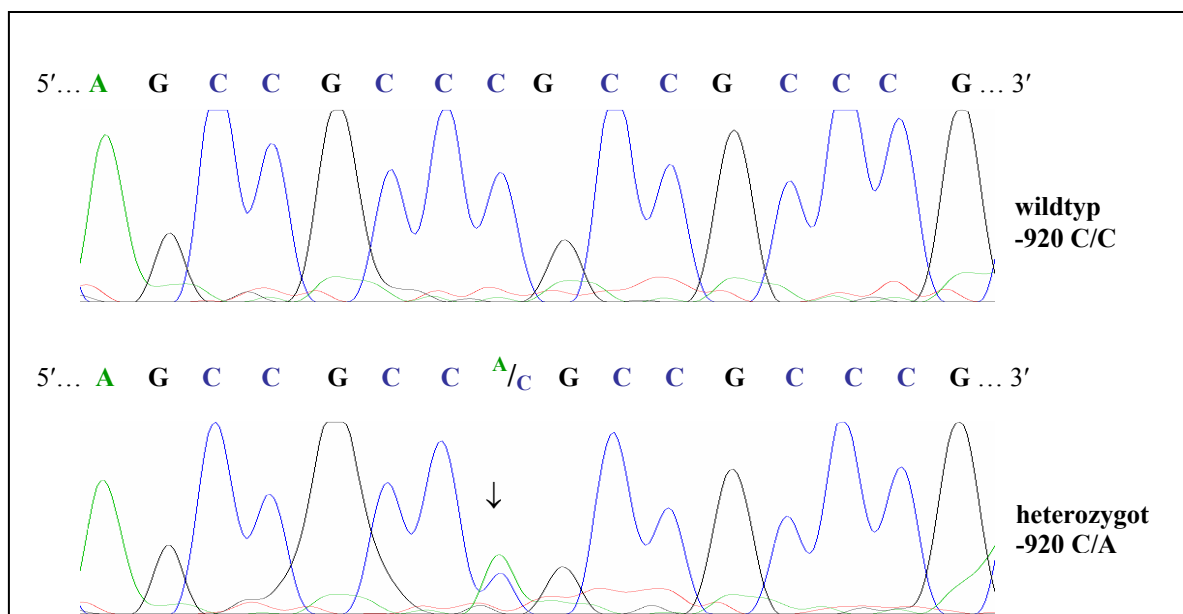


Abbildung 3-8: Sequenzanalyse der Variante -920C>A in SOCS-3. Der Ausschnitt zeigt die Nukleotidpositionen -927 bis -912. Oben: Wildtyp Sequenz. Unten: Sequenz der heterozygoten Variante mit dem Basenaustausch C>A an Position -920 (s. Pfeil).

Die Variante führt zu keiner Zerstörung bzw. Generierung einer Erkennungssequenz eines geeigneten Restriktionsenzym, so dass eine Identifizierung der Allele über die PCR-RFLP nicht möglich war. Daher wurde eine Tetra-ARMS PCR mit allelspezifischen Primern zur Genotypisierung durchgeführt (s. *Abbildung 3-14*).

SOCS-3 -985 G>T

Das in *Abbildung 3-9* dargestellte SSCA-Bandenmuster konnte im initialen Mutationsscreening von *SOCS-3 prom* nur bei zwei extrem adipösen Probanden sowie einer untergewichtigen Kontrollperson gefunden werden.

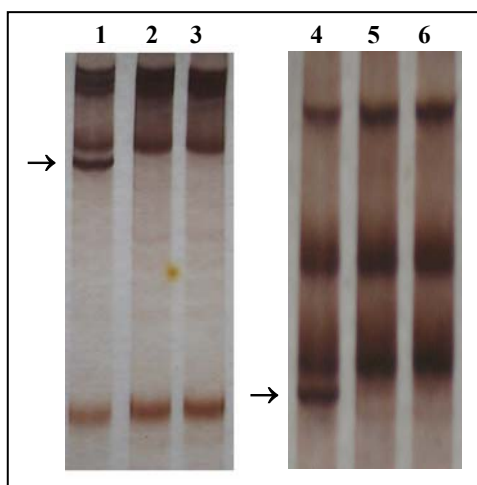


Abbildung 3-9: Ausschnitt aus SSCA-Gelen mit der Variante -985G>T in SOCS-3. Ein Nachweis der Variante ist bei beiden Lauftemperaturen möglich (links: 4°C, rechts: Raumtemperatur). Die zusätzliche Bande in Spur 1 bzw. Spur 4 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Sequenzanalyse der entsprechenden DNA-Proben ergab einen Nukleotidaustausch von Guanin zu Thymin an Position -985 des *SOCS-3* Promoters (s. *Abbildung 3-10*). Da durch den Basenaustausch die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *BseDI* (5'...C/CNNGG...3') zerstört wird, konnte die Sequenzveränderung mit Hilfe der PCR-RFLP bestätigt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Aufgrund der niedrigen Frequenz im Mutationsscreening wurde diese seltene Variante nicht für weitergehende Untersuchungen herangezogen.

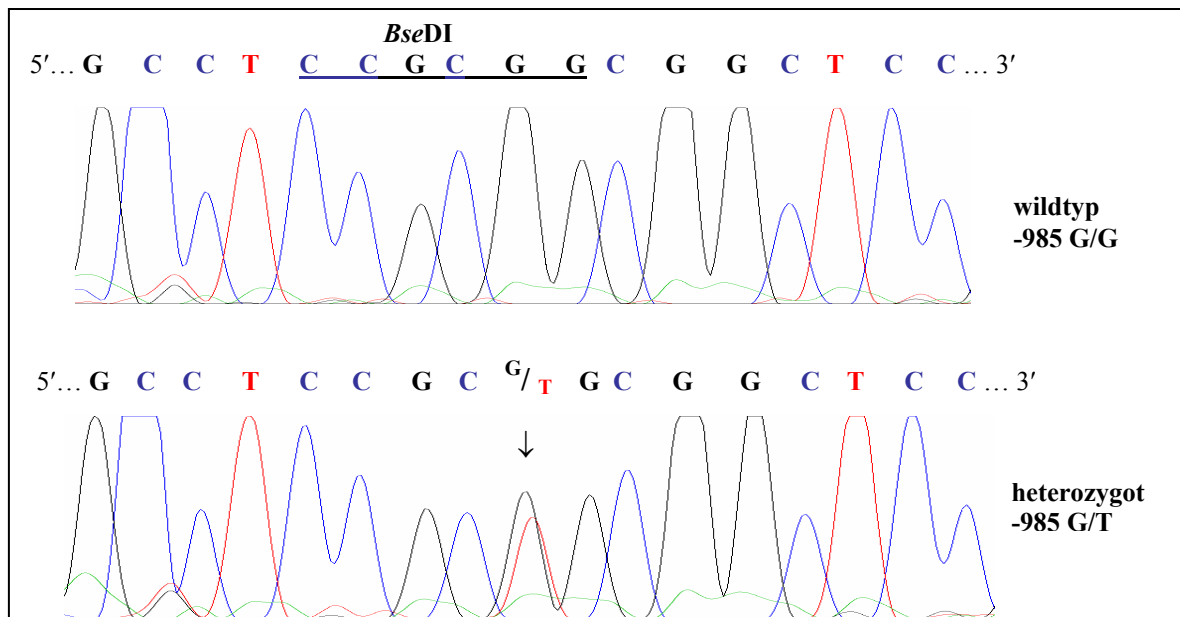


Abbildung 3-10: Sequenzanalyse der Variante -985G>T in SOCS-3. Der Ausschnitt zeigt die Nukleotidpositionen -993 bis -977. Oben: Wildtyp Sequenz. Unten: Sequenz der heterozygoten Variante. Durch den Basenaustausch G>A an Position -985 (s. Pfeil) wird die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *BseDI* (unterstrichen) zerstört.

SOCS-3 -1037T>C

Das in *Abbildung 3-11* dargestellte SSCA-Bandemuster wurde im initialen Mutationsscreening nur bei einem extrem adipösen Probanden gefunden.

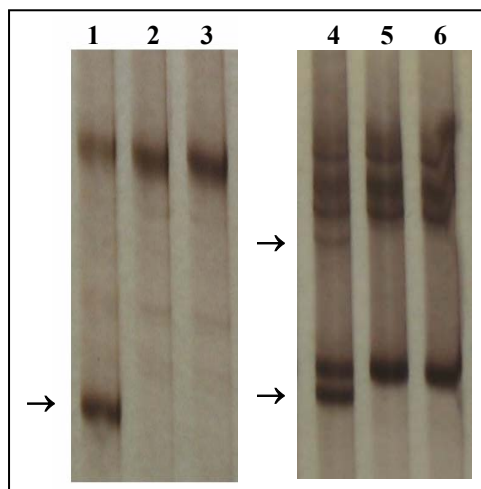


Abbildung 3-11: Ausschnitt aus SSCA-Gelen mit der Variante -1037T>C in SOCS-3. Ein Nachweis der Variante ist bei beiden Lauftemperaturen möglich (links: 4°C, rechts: Raumtemperatur). Die zusätzliche Bande in Spur 1 bzw. Spur 4 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Sequenzanalyse ergab einen Nukleotidaustausch von Thymin zu Cytosin an Position -1037 des *SOCS-3* Promoters (s. *Abbildung 3-12*). Da durch den Basenaustausch die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *HinfII* (5'...G/ANTC...3') zerstört wird, konnte die Sequenzveränderung mit Hilfe der PCR-RFLP bestätigt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Aufgrund der niedrigen Frequenz im Mutationsscreening wurde diese seltene Variante jedoch von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

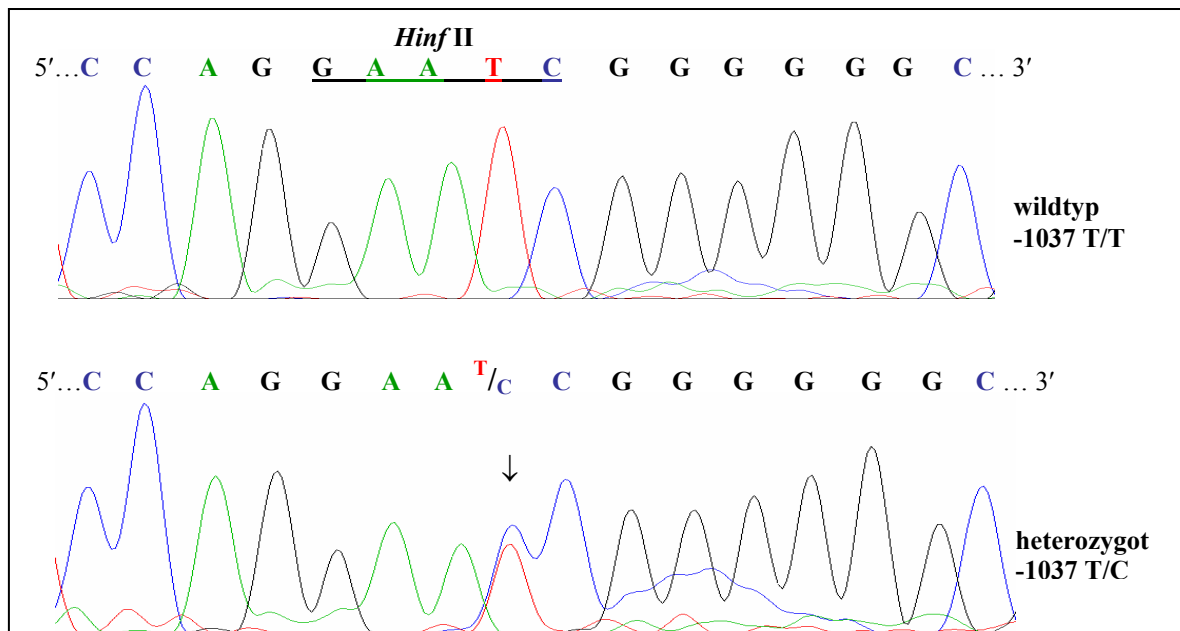


Abbildung 3-12: Sequenzanalyse der Variante -1037T>C in SOCS-3. Der Ausschnitt zeigt die Nukleotidpositionen -1044 bis -1029. Oben: Wildtyp Sequenz. Unten: Sequenz der heterozygoten Variante. Durch den Basenaustausch T>C an Position -1037 (s. Pfeil) wird die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *HinfII* (unterstrichen) zerstört.

3.2.2 Genotypisierung der SOCS-3 Variante -1044C>A

Da die im *SOCS-3* Promoter identifizierte Variante -1044C>A die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *MvaI* zerstört, erhält man nach Restriktion des 345 bp Fragmentes *SOCS-3-prom* mit *MvaI* unterschiedliche Banden beim Wildtyp (175 bp, 158 bp und 12 bp) und bei der Variante (333 bp und 12 bp; s. *Abbildung 3-13*).

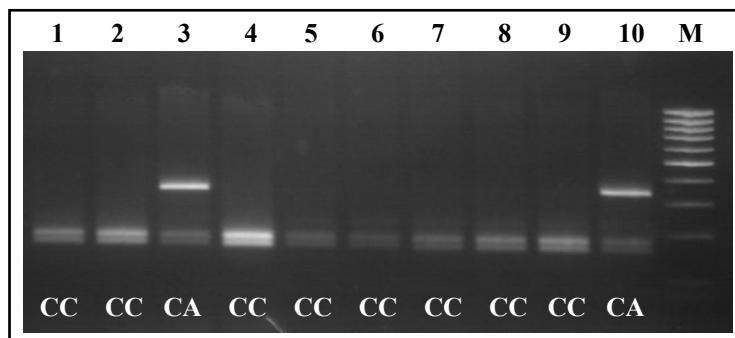


Abbildung 3-13: PCR-RFLP Genotypisierung der Variante -1044C>A in SOCS-3. Restriktion des 345 bp PCR-Fragmentes *SOCS-3 prom* mit *MvaI*. Wildtyp (CC): 175 bp, 158 bp und 12 bp, heterozygote Variante (CA): 333 bp und 12 bp. M: 100-bp DNA-Längenmarker.

Die PCR-RFLP Genotypisierung von -1044C>A (s. *Tabelle 2-9*) erfolgte bei 181 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen und 278 untergewichtigen Kontrollpersonen. Die Allel- bzw. Genotypfrequenzen und Ergebnisse der Assoziationsanalyse sind in *Tabelle 3-3* aufgeführt. Für eine PDT-Analyse wurde der SNP zusätzlich in 703 unabhängigen Trios und Quartetten an insgesamt 1968 Personen genotypisiert. Die Ergebnisse sind *Tabelle 3-4* zu entnehmen.

3.2.3 Genotypisierung der *SOCS-3* Variante -920C>A

Die Genotypisierung des identifizierten Promoter SNPs -920C>A erfolgte mit Hilfe der Tetra-ARMS-PCR (s. *Tabelle 2-10*). Durch die PCR-Amplifikation mit allelspezifischen Primern entsteht bei Personen mit zwei Wildtyp-Allelen (CC) eine Bande von 170 bp und bei homozygoten Variantenträgern (AA) eine Bande von 210 bp. Heterozygote Variantenträger (CA) zeigen beide Banden. Durch das Kontroll-Primerpaar entsteht bei allen Proben zusätzlich eine Bande von 338 bp (s. *Abbildung 3-14*).

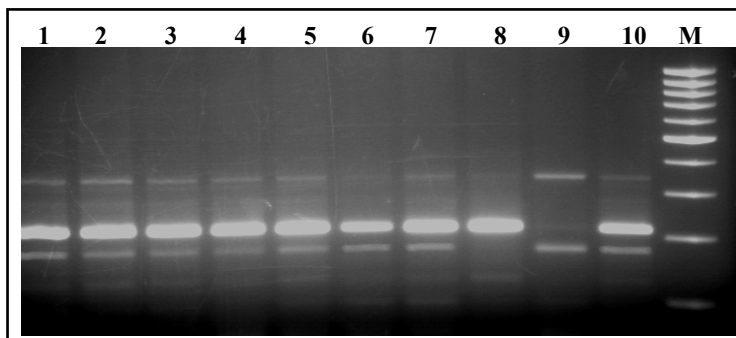


Abbildung 3-14: Tetra-ARMS PCR zur Genotypisierung von -920C>A in *SOCS-3*. Durch Amplifikation mit allelspezifischen Primern zeigen Träger des A-Allels eine Bande von 210 bp und Träger des C-Allels eine Bande von 170 bp. Heterozygote (CA) zeigen beide Banden. Bei allen Proben entsteht durch das Kontroll-Primerpaar eine Bande von 338 bp. M: 123-bp DNA-Längenmarker.

Es wurden 181 extrem adipöse Kinder und Jugendliche und 278 untergewichtige Kontrollpersonen genotypisiert. Anhand der Genotyp- und Allelfrequenzen in der jeweiligen Studiengruppe wurde ein Assoziationstest durchgeführt (s. *Tabelle 3-3*).

3.3 Genotypisierung der Varianten *IRS-1* Arg972Gly und *IRS-2* Gly1057Asp

Die Genotypisierung des Datenbank-SNPs Arg972Gly in *IRS-1* erfolgte über PCR-RFLP (s. *Tabelle 2-9*). Nach Restriktion des 221 bp Fragmentes mit *Bst*NI entstehen bei Personen mit zwei Wildtyp-Allelen (GG) Banden von 215 bp und 6 bp und bei homozygoten Variantenträgern (AA) Banden von 6 bp, 44 bp und 171 bp. Heterozygote Variantenträger (GA) zeigen beide Bandenmuster (s. *Abbildung 3-15*).

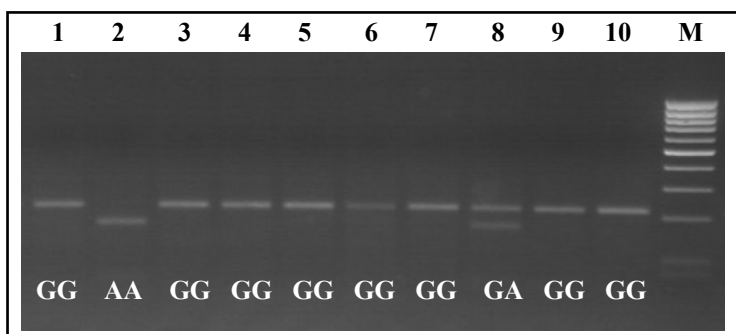


Abbildung 3-15: PCR-RFLP Genotypisierung der *IRS-1* Variante Arg972Gly. Restriktion des 221 bp PCR-Fragmentes *IRS-1* mit *Bst*NI: Wildtyp (GG): 215 bp und 6 bp, homozygote Variante (AA): 171 bp, 44 bp und 6 bp. Heterozygote Varianten (GA) zeigen entsprechend beide Bandenmuster. M: 100-bp DNA-Längenmarker.

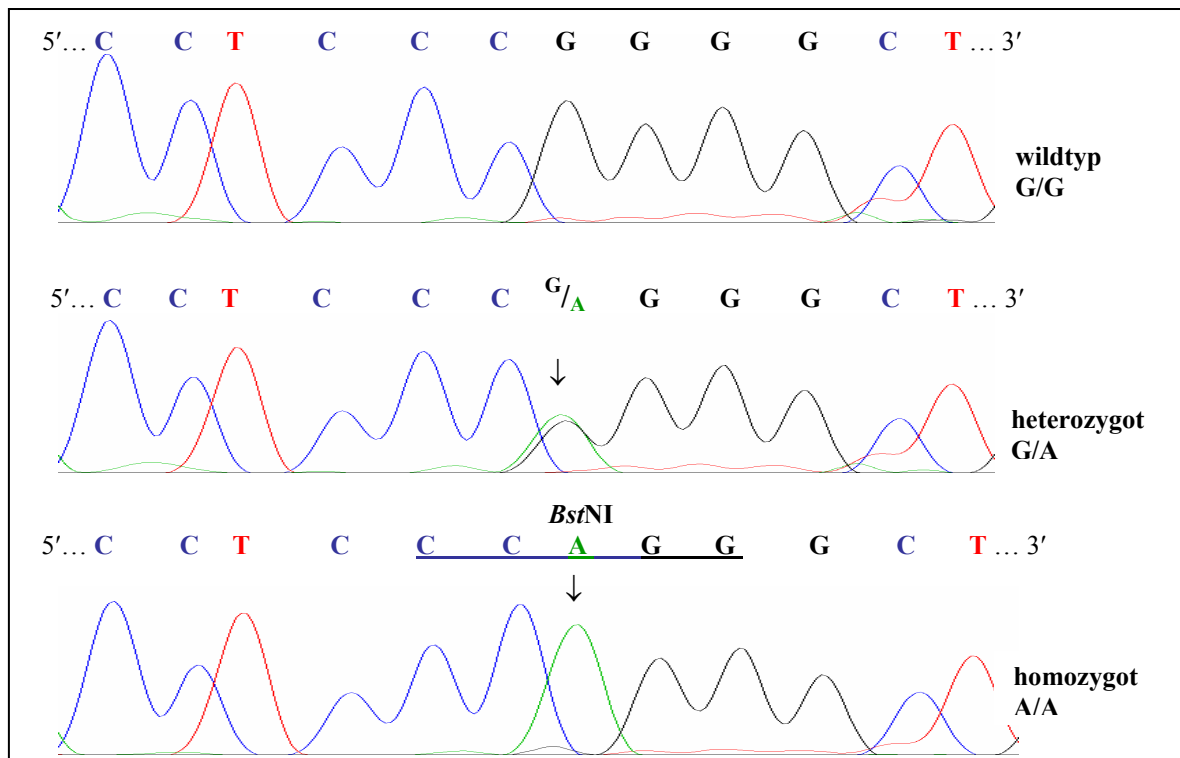


Abbildung 3-16: Sequenzanalyse der verschiedenen Genotypen der Variante IRS-1 rs1801278 (Arg972Gly). Das Restriktionsenzym *Bst*NI mit der Erkennungssequenz 5'...CC/A_TGG...3' (unterstrichen) schneidet nur das A-Allel bei homo- bzw. heterozygoten Variantenträgern (s. Pfeil).

Abbildung 3-16 zeigt eine Sequenzanalyse der verschiedenen Genotypen der Variante Arg972Gly in *IRS-1*.

Die Genotypisierung des Datenbank-SNPs Gly1057Asp in *IRS-2* erfolgte über PCR-RFLP (s. Tabelle 2-9). Nach der Restriktion des 438 bp Fragmentes mit *Hae*II entstehen beim Wildtyp Banden von 195 bp, 181 bp und 62 bp und bei der Variante Banden von 376 und 62 bp (s. Abbildung 3-17). Nach einer Überprüfung der verschiedenen Genotypen durch eine Sequenzanalyse (s. Abbildung 3-18) erfolgte eine Genotypisierung beider SNPs via PCR-RFLP in 181 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 278 untergewichtigen Kontrollpersonen. Anhand der Genotyp- und Allelfrequenzen in der jeweiligen Studiengruppe wurde ein Assoziationstest durchgeführt (s. Tabelle 3-5).

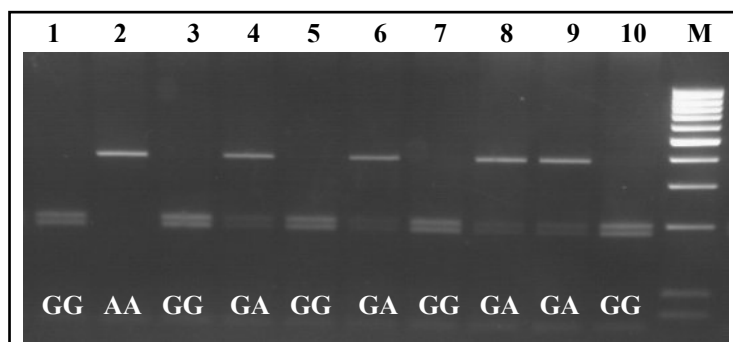


Abbildung 3-17: PCR-RFLP Genotypisierung der IRS-2 Variante Gly1057Asp. Restriktion des 438 bp PCR Fragmentes *IRS-2* mit *Hae*II: wildtyp (GG): 195 bp, 181 bp und 62 bp, homozygote Variante (AA): 376 bp und 62 bp), heterozygote Varianten (GA) zeigen beide Bandenmuster. M: 100-bp DNA-Längenmarker.

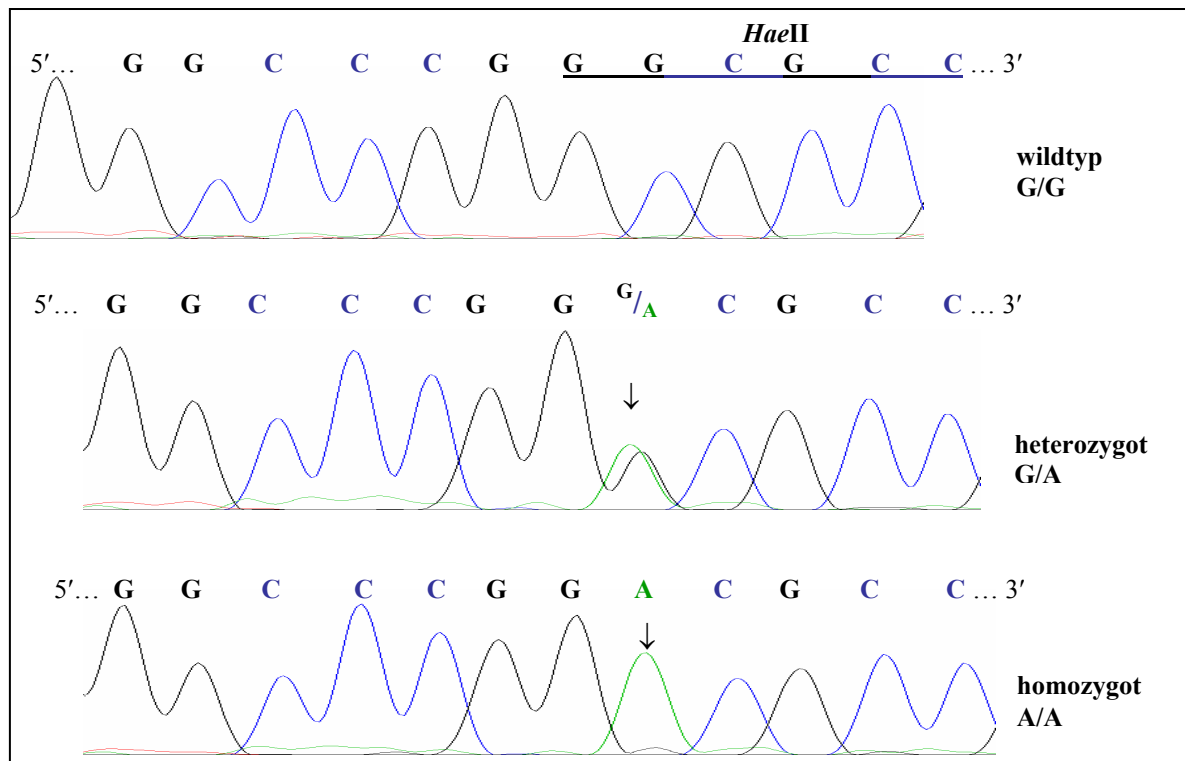


Abbildung 3-18: Sequenzanalyse der verschiedenen Genotypen der Variante IRS-2 rs1805097 (Gly1057Asp). Das Restriktionsenzym *HaeII* mit der Erkennungssequenz 5'...^AGCGC/C_T...3' (unterstrichen) schneidet nur das wildtypische G-Allel.

3.4 SNP-Analyse weiterer Kandidatengene

Die SNP-Analyse mit Hilfe der MALDI-TOF MS Hochdurchsatz-Genotypisierung erfolgte in Kooperation mit dem GSF-Forschungszentrum Neuherberg unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Meitinger. Für 29 selektierte Datenbank-SNPs in 20 Kandidatengenen (s. *Tabelle 3-2*) wurden anhand der Datenbanksequenzen Extensionsprimer abgeleitet und die Bedingungen die Primer-Extensionsreaktion etabliert. An 100 Kontroll-Allelen wurde ein spezifischer SNP-Nachweis durchgeführt, um die Allelfrequenzen abschätzen zu können. SNPs, die sich hierbei monomorph darstellten wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Wenn die Heterozygotenfrequenz im Probelauf über 20% lag und die Genotypisierungsdaten keine Abweichung vom HWG aufwiesen, erfolgte die SNP-Analyse in einem Kollektiv aus 184 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen und 184 untergewichtigen Kontrollpersonen. Mit den Daten der Hochdurchsatz-Genotypisierung wurden Assoziationsanalysen durchgeführt, um Aufschluss über die Relevanz der einzelnen Kandidatengene zu erhalten (s. *Tabelle 3-6*). Bei einem *p*-Wert kleiner 0,2 im Assoziationstest wurden die entsprechenden SNPs für eine TDT-Analyse zusätzlich in 368 unabhängigen Trios genotypisiert (s. *Tabelle 3-7*).

3.5 Statistische Befunde

Die statistischen Berechnungen der vorliegenden Arbeit wurden von André Scherag und Thuy Trang Nguyen am Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Schäfer durchgeführt.

3.5.1 Assoziationsanalyse der Varianten -1044C>A und -920C>A in SOCS-3

Die Untersuchung der SNPs -1044C>A und -920C>A mittels PCR-RFLP (s. Kapitel 3.2.2) bzw. Tetra-ARMS PCR (Kapitel 3.2.3) ergab in den untersuchten Studiengruppen keinen Hinweis auf Assoziation. Die 181 extrem adipösen Kinder und Jugendlichen unterschieden sich in ihrer Genotypverteilung nicht von den 278 untergewichtigen Kontrollpersonen. Alle *p*-Werte lagen über 0,05. Die Allel- bzw. Genotypfrequenzen und Ergebnisse der Assoziationsanalysen sind *Tabelle 3-3* zu entnehmen.

Tabelle 3-3: Assoziationsergebnisse, Allel- und Genotypfrequenzen der SOCS-3 Varianten -1044C>A und -920C>A

Studiengruppen	Genotypfrequenzen [#]			Allelfrequenzen	
SOCS-3 -1044C>A	CC	CA	AA	C-Allel	A-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n= 181)*	174 (96,13%)	7 (3,87%)	0 (0,00%)	355 (98,07%)	7 (1,93%)
untergewichtige Kontrollpersonen (n= 278)**	270 (97,12%)	8 (2,88%)	0 (0,00%)	548 (98,56%)	8 (1,44%)
<i>p</i>-Wert	0,56 ^c			0,60 ^f	
SOCS-3 -920C>A	CC	CA	AA	C-Allel	A-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n= 181)*	144 (79,56%)	35 (19,34%)	2 (1,10%)	323 (89,23%)	39 (10,77%)
untergewichtige Kontrollpersonen (n=278)**	235 (84,53%)	40 (14,39%)	3 (1,08%)	510 (91,73%)	46 (8,27%)
<i>p</i>-Wert	0,25 ^b			0,24 ^f	

[#] Genotypfrequenzen im Hardy-Weinberg Gleichgewicht; * 181 (91 weiblich) unabhängige extrem adipöse Kinder und Jugendliche mit einem BMI ≥ 90 . Perzentile (mittlerer BMI 35,6 +/- 6,12 kg/m², mittleres Alter 14,31 +/- 2,40 Jahre); ** 278 (141 weiblich) untergewichtige Erwachsene mit einem BMI ≤ 15 . Perzentile (mittlerer BMI 18,23 +/- 1,11 kg/m², mittleres Alter 24,98 +/- 3,68 Jahre); ^b Cochran-Armitage Trend (exakt, zweiseitig); ^c Pearson's Chi-square Test (asymptotisch, zweiseitig); ^f Fisher's Exact Test (zweiseitig)

3.5.2 Pedigree Disequilibrium Test von *SOCS-3* -1044C>A

Um Stratifikationseffekte zu umgehen wurde die möglicherweise funktionell relevante Variante -1044C>A (s. Kapitel 4.2.2) zusätzlich in 703 unabhängigen Adipositas-Familien mittels PCR-RFLP genotypisiert (s. Kapitel 3.2.2). Der *Pedigree Transmission Disequilibrium Test* (PDT) diente der Überprüfung, ob das Markerallel überzufällig häufig von einem Elternteil an den adipösen Indexprobanden transmittiert wird. Die 703 Familien der PDT-Analyse umfassten 987 Trios, die über ein extrem adipöses Kind ermittelt wurden. In diesen Trios wurde das C-Allel 1952-mal transmittiert und 1947-mal nicht weitervererbt. Für das A-Allel wurden 16 Transmissionen und 21 Nicht-Transmissionen beobachtet. Somit ergab die PDT-Analyse keinen Hinweis auf ein Vererbungsungleichgewicht ($p = 0,30$; s. Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: PDT-Analyse von -1044C>A im *SOCS-3* Promoter.

<i>SOCS-3</i> -1044C>A	Allel	transm.	nicht-transm.	Transmissionsrate (%)
703 Trios/ Quartette*	C	1952	1947	50,06
	A	16	21	43,24
p-Wert	0,30 [#]			

* 987 (542 weiblich) extrem adipöse Kinder und Jugendliche mit einem BMI ≥ 90 . Perzentile (mittlerer BMI 31,06 \pm 6,00 kg/m², mittleres Alter 14,00 \pm 3,40 Jahre);

[#] nach Martin *et al.* 2000

3.5.3 Assoziationsanalyse von *IRS-1* Arg972Gly und *IRS-2* Gly1057Asp

Die Varianten *IRS-1* Arg972Gly und *IRS-2* Gly1057Asp wurde wie oben beschrieben genotypisiert (s. Kapitel 3.3). Tabelle 3-5 zeigt die Verteilung der Allele bei untersuchten extrem adipösen und untergewichtigen Individuen. Die Assoziationsanalyse des Markers Arg972 für die 181 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen verglichen mit den 278 untergewichtigen Kontrollpersonen ergab keinen Hinweis auf eine Assoziation ($p = 0,34$ im Alleltest; $p = 0,43$ im Genotyptest). Ebenso ähnlich waren die Allel- und Genotypfrequenzen des Markers Gly1057Asp im gleichen Kollektiv ($p = 0,18$ im Alleltest; $p = 0,19$ im Genotyptest; s. Tabelle 3-5).

Tabelle 3-5: Allel- und Genotypfrequenzen der Varianten IRS-1 Arg972Gly und IRS-2 Gly1057Asp

Studiengruppen	Genotypfrequenzen [#]			Allelfrequenzen	
IRS-1 Arg972Gly	GG	GA	AA	G-Allel	A-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n= 181)*	160 (88,40%)	20 (11,05%)	1 (0,55%)	340 (93,92%)	22 (6,08%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n= 278)**	239 (85,97%)	35 (12,59%)	4 (1,44%)	513 (92,27%)	43 (7,73%)
p-Wert	0,43 ^a			0,34 ^c	
IRS-2 Gly1057Asp	GG	GA	AA	G-Allel	A-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n= 181)*	84 (46,41%)	75 (41,44%)	22 (12,15%)	243 (67,13%)	119 (32,87%)
untergewichtige Kontrollpersonen (n= 278)**	113 (40,65%)	123 (44,24%)	42 (15,11%)	349 (62,77%)	207 (37,23%)
p-Wert	0,19 ^b			0,18 ^c	

Genotypfrequenzen im Hardy-Weinberg Gleichgewicht; * 181 (91 weiblich) unabhängige extrem adipöse Kinder und Jugendliche mit einem BMI ≥ 90 . Perzentile (mittlerer BMI 35,6 +/- 6,12 kg/m², mittleres Alter 14,31 +/- 2,40 Jahre); ** 278 (141 weiblich) untergewichtige Erwachsene mit einem BMI ≤ 15 . Perzentile (mittlerer BMI 18,23 +/- 1,11 kg/m², mittleres Alter 24,98 +/- 3,68 Jahre); ^a Cochran-Armitage Trend (asymptotisch, zweiseitig); ^b Cochran-Armitage Trend (exakt, zweiseitig); ^c Pearson's Chi-square Test (asymptotisch, zweiseitig)

3.5.4 Kandidatengene der SNP-Analyse: Assoziationstest und TDT

Insgesamt wurden 29 Datenbank-SNPs aus 20 ausgewählten Kandidatengenen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie in einem Kollektiv aus 184 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 184 untergewichtigen Kontrollpersonen genotypisiert. Die Genotypisierungen wurden im Hochdurchsatzverfahren von den Kooperationspartnern am GSF-Forschungszentrum Neuherberg unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Thomas Meitinger durchgeführt (s. Kapitel 3.4).

Anhand der Genotypisierungsdaten der 29 untersuchten SNPs erfolgten Assoziationsanalysen. Die Allel- und Genotypfrequenzen sowie der Ergebnisse der Assoziationsanalysen sind in *Tabelle 3-6* dargestellt.

Tabelle 3-6: Allel- und Genotypfrequenzen der Varianten in ausgewählten Kandidatengenen der Leptin-Signalkaskade

Studiengruppen	Genotypfrequenzen [#]			Allelfrequenzen	
STAT3 rs2293152	CC	GC	GG	C-Allel	G-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=183)*	31 (16,94 %)	79 (43,17%)	73 (39,89%)	141 (38,52%)	225 (61,48%)
Untergewichtige Kontrollpersonen(n=180)**	32 (17,78%)	86 (47,78%)	62 (34,44%)	150 (41,67%)	210 (58,34%)
<i>p</i> -Wert	0,40 ^a			0,39 ^e	
STAT3 rs2306581	AA	CA	CC	A-Allel	C-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=182)	26 (14,29%)	85 (46,70%)	71 (39,01%)	137 (37,64%)	227 (62,36%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n= 182)	22 (12,09%)	81 (44,51%)	79 (43,41%)	125 (34,34%)	239 (65,66%)
<i>p</i> -Wert	0,36 ^a			0,35 ^e	
STAT3 rs744166	CC	CA	AA	C-Allel	A-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=182)	31 (17,03%)	87 (47,80%)	64 (35,16%)	149 (40,93%)	215 (59,07%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=184)	27 (14,67%)	96 (52,17%)	61 (33,15%)	150 (40,76%)	218 (59,24%)
<i>p</i> -Wert	0,96 ^a			0,96 ^e	
AMPK α2 rs1124900	GG	GT	TT	G-Allel	T-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=174)	58 (33,33%)	91 (52,30%)	25 (14,37%)	207 (59,48%)	141 (40,52%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=176)	41 (23,30%)	93 (52,84%)	42 (23,86%)	175 (49,72%)	177 (50,28%)
<i>p</i> -Wert	0,01 ^a			0,01 ^e	
AMPK α2 rs1418442	AA	AG	GG	A-Allel	G-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=183)	38 (20,77%)	103 (56,28%)	42 (22,95%)	179 (48,91%)	187 (51,09%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=182)	51 (28,02%)	93 (51,10%)	38 (20,88%)	195 (53,57%)	169 (46,43%)
<i>p</i> -Wert	0,19 ^a			0,21 ^e	

-Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt-

-Fortsetzung von Tabelle 3-6-

Studiengruppen	Genotypfrequenzen [#]			Allelfrequenzen	
TYK2 rs280519	AA	GA	GG	A-Allel	G-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=173)	34 (19,65%)	94 (54,34%)	45 (26,01%)	162 (46,82%)	184 (53,18%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=174)	41 (23,56%)	93 (53,45%)	40 (22,99%)	175 (50,29%)	173 (49,71%)
<i>p</i> -Wert	0,34^a			0,36^e	
TYK2 rs280496	CC	CG	GG	C-Allel	G-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=182)	102 (56,04%)	69 (37,91%)	11 (6,04%)	273 (75,00%)	91 (25,00%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=181)	96 (53,04%)	81 (44,75%)	4 (2,21%)	273 (75,41%)	89 (24,59%)
<i>p</i> -Wert	0,89^a			0,90^e	
Jak2 rs2274472	AA	GA	GG	A-Allel	G-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=164)	15 (9,15%)	66 (40,24%)	83 (50,61%)	96 (29,27%)	232 (70,73%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=173)	64 (36,99%)	82 (47,40%)	27 (15,61%)	210 (60,69%)	136 (39,31%)
<i>p</i> -Wert	0,92^a			0,92^e	
mTOR rs718206	AA	AT	TT	A-Allel	T-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=171)	79 (46,20%)	75 (43,86%)	17 (9,94%)	233 (68,13%)	109 (31,87%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=170)	91 (53,53%)	61 (35,88%)	18 (10,59%)	243 (71,47%)	97 (28,53%)
<i>p</i> -Wert	0,35^a			0,34^e	
mTOR rs742824	AA	AG	GG	A-Allel	G-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=183)	80 (43,72%)	84 (45,90%)	19 (10,38%)	244 (66,67%)	122 (33,34%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=146)	73 (50,00%)	56 (38,36%)	17 (11,64%)	202 (69,18%)	90 (30,82%)
<i>p</i> -Wert	0,50^a			0,50^a	

-Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt-

-Fortsetzung von Tabelle 3-6-

Studiengruppen	Genotypfrequenzen [#]			Allelfrequenzen	
FOS rs1046117	CC	CT	TT	C-Allel	T-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=181)	13 (7,18%)	74 (40,88%)	94 (51,93%)	100 (27,62%)	262 (72,38%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=181)	17 (9,39%)	72 (39,78%)	92 (50,83%)	106 (29,28%)	256 (70,72%)
<i>p</i> -Wert	0,62^a			0,62^e	
FOS rs1063169	GG	GT	TT	G-Allel	T-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=182)	122 (67,03%)	54 (29,67%)	6 (3,30%)	298 (81,87%)	66 (18,13%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=182)	138 (75,82%)	41 (22,53%)	3 (1,65%)	317 (87,09%)	47 (12,91%)
<i>p</i> -Wert	0,07^b			0,05^e	
MAPK1 rs2266965	AA	AG	GG	A-Allel	G-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=183)	49 (26,78%)	90 (49,18%)	44 (24,04%)	188 (51,37%)	178 (48,63%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=182)	54 (29,67%)	89 (48,90%)	39 (21,43%)	197 (54,12%)	167 (45,88%)
<i>p</i> -Wert	0,46^a			0,46^e	
MAPK1 rs2283794	CC	TC	TT	C-Allel	T-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=184)	54 (29,35%)	90 (48,91%)	40 (21,74%)	198 (53,80%)	170 (46,20%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=182)	44 (24,18%)	90 (49,45%)	48 (26,37%)	178 (48,90%)	186 (51,10%)
<i>p</i> -Wert	0,19^a			0,18^e	
MAPK8 rs2289805	GG	TG	TT	G-Allel	T-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=183)	4 (2,19%)	40 (21,86%)	139 (75,96%)	48 (13,11%)	318 (86,89%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=179)	4 (2,23%)	47 (26,26%)	128 (71,51%)	55 (15,36%)	303 (84,64%)
<i>p</i> -Wert	0,40^b			0,39^e	

-Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt-

-Fortsetzung von Tabelle 3-6-

Studiengruppen	Genotypfrequenzen [#]			Allelfrequenzen	
CSNK2A1 rs459710	CC	TC	TT	C-Allel	T-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=164)	21 (12,80%)	74 (45,12%)	69 (42,07%)	116 (35,37%)	212 (64,63%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=166)	23 (13,86%)	71 (42,77%)	72 (43,37%)	117 (35,24%)	215 (64,76%)
<i>p</i> -Wert	0,97^a			0,97^e	
CSNK2A1 rs157816	CC	CT	TT	C-Allel	T-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=172)	73 (42,44%)	76 (44,19%)	23 (13,37%)	222 (64,53%)	122 (35,47%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=170)	78 (45,88%)	73 (42,94%)	19 (11,18%)	229 (67,35%)	111 (32,65%)
<i>p</i> -Wert	0,44^a			0,44^e	
EPHB2 rs309485	CC	CG	GG	C-Allel	G-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=182)	3 (1,65%)	25 (13,74%)	154 (84,62%)	31 (8,52%)	333 (91,48%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=182)	3 (1,65%)	30 (16,48%)	149 (81,87%)	36 (9,89%)	328 (90,11%)
<i>p</i> -Wert	0,63^b			0,52^e	
EPHB2 rs116119	CC	CT	TT	C-Allel	T-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=183)	41 (22,40%)	99 (54,10%)	43 (23,50%)	181 (49,45%)	185 (50,55%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=182)	44 24,18%	86 47,25%	52 (28,57%)	174 (47,80%)	190 (52,20%)
<i>p</i> -Wert	0,65^a			0,66^e	
GRB2 rs1076094	CC	TC	TT	C-Allel	T-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=183)	105 (57,38%)	67 (36,61%)	11 (6,01%)	277 (75,68%)	89 (24,32%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=182)	110 (60,44%)	62 (34,07%)	10 (5,49%)	282 (77,47%)	82 (22,53%)
<i>p</i> -Wert	0,57^a			0,57^e	

-Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt-

-Fortsetzung von Tabelle 3-6-

Studiengruppen	Genotypfrequenzen [#]			Allelfrequenzen	
<i>PTPN11</i> rs2301756	CC	TC	TT	C-Allel	T-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=182)	0 (0,00 %)	31 (17,03%)	151 (82,97%)	31 (8,52%)	333 (91,48%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=181)	3 (1,66%)	42 (23,20%)	136 (75,14%)	48 (13,26%)	314 (86,74%)
<i>p</i> -Wert	0,05 ^b			0,04 ^e	
<i>RAF1</i> rs1039244	CC	CG	GG	C-Allel	G-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=183)	126 (68,85%)	54 (29,51%)	3 (1,64%)	306 (83,61%)	60 (16,39%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=179)	112 (62,57%)	58 (32,40%)	9 (5,03%)	282 (78,77%)	76 (21,23%)
<i>p</i> -Wert	0,09 ^a			0,10 ^e	
<i>SLC2A4</i> rs5435	CC	TC	TT	C-Allel	T-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=167)	69 (41,32%)	74 (44,31%)	24 (14,37%)	212 (63,47%)	122 (36,53%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=169)	70 (41,42%)	82 (48,52%)	17 (10,06%)	222 (65,68%)	116 (34,32%)
<i>p</i> -Wert	0,55 ^a			0,55 ^e	
<i>PIAS1</i> rs1489595	AA	GA	GG	A-Allel	G-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=184)	155 (84,24%)	28 (15,22%)	1 (0,54%)	338 (91,85%)	30 (8,15%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=183)	146 (79,78%)	35 (19,13%)	2 (1,09%)	327 (89,34%)	39 (10,66%)
<i>p</i> -Wert	0,26 ^b			0,25 ^e	
<i>PRKCA</i> rs721429	CC	CT	TT	C-Allel	T-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=174)	51 (29,31%)	94 (54,02%)	29 (16,67%)	196 (56,32%)	152 (43,68%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=176)	65 (36,93%)	79 (44,89%)	32 (18,18%)	209 (59,38%)	143 (40,63%)
<i>p</i> -Wert	0,41 ^a			0,41 ^e	

-Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt-

-Fortsetzung von Tabelle 3-6-

Studiengruppen	Genotypfrequenzen [#]			Allelfrequenzen	
PTK2 rs306957	AA	AG	GG	A-Allel	G-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=182)	56 (30,77%)	86 (47,25%)	40 (21,98%)	198 %	166 %
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=182)	58 (31,87%)	97 (53,30%)	27 (14,84%)	213 (58,52%)	151 (41,58%)
<i>p</i> -Wert	0,26 ^a			0,26 ^e	
PTK2B rs956152	CC	TC	TT	C-Allel	T-Allel
Extrem adipöse Kinder und Jugendliche (n=179)	129 (72,07%)	46 (25,70%)	4 (2,23%)	304 (84,92%)	54 (15,08%)
Untergewichtige Kontrollpersonen (n=152)	121 (79,61%)	30 (19,74%)	1 (0,66%)	272 (89,47%)	32 (10,53%)
<i>p</i> -Wert	0,10 ^b			0,08 ^e	

Genotypfrequenzen im Hardy-Weinberg Gleichgewicht; * 184 (92 weiblich) unabhängige extrem adipöse Kinder und Jugendliche mit einem BMI ≥ 90 . Perzentile (mittlerer BMI 45,65 \pm 6,11 kg/m², mittleres Alter 14,36 \pm 2,42 Jahre); ** 184 (92 weiblich) untergewichtige Erwachsene mit einem BMI ≤ 15 . Perzentile (mittlerer BMI 18,30 \pm 1,07 kg/m², mittleres Alter 25,57 \pm 3,84 Jahre); Test für Genotypen: ^a Cochran-Armitage Trend (asymptotisch, zweiseitig), ^b Cochran-Armitage Trend (exakt, zweiseitig), ^c Pearson's Chi-square Test (asymptotisch, zweiseitig), ^d Fisher's Exact Test (zweiseitig); Test für Allele: ^e Pearson's Chi-square Test (asymptotisch, zweiseitig), ^f Fisher's Exact Test (zweiseitig)

Die SNPs, bei denen der Assoziationstest eine Tendenz zu einer positiven Assoziation ergab ($p < 0,2$), wurden anschließend in insgesamt 368 unabhängigen Trios analysiert. Dies traf für SNPs in den Genen *AMPK α 2* ($p = 0,01$), *FOS* ($p = 0,07$), *PTPN11* ($p = 0,05$) und *RAF1* ($p = 0,09$) zu (s. *Tabelle 3-6*).

Anhand des TDT-Tests sollte überprüft werden, ob das entsprechende Markerallel überzufällig häufig von einem heterozygoten Elternteil an den adipösen Indexprobanden transmittiert wird. Wie die Ergebnisse der TDT-Statistik zeigen, konnte in keinem Fall der initiale Trend bestätigt werden. Alle p -Werte überschritten 0,05 (s. *Tabelle 3-7*).

Tabelle 3-7: TDT-Analyse ausgewählter Kandidatengene der Leptin-Signalkaskade.

<i>AMPK α 2</i> rs1124900	Allel	transm.	nicht-transm.	Transmissionsrate (%)
349 Trios*	G	166	183	47,56
	T	183	166	52,44
p-Wert	0,36[#]			
<i>FOS</i> rs1063169	Allel	transm.	nicht-transm.	Transmissionsrate (%)
211 Trios*	G	103	108	48,82
	T	108	103	51,18
p-Wert	0,73[#]			
<i>PTPN11</i> rs2301756	Allel	transm.	nicht-transm.	Transmissionsrate (%)
113 Trios*	C	51	62	45,13
	T	62	51	54,87
p-Wert	0,30[#]			
<i>RAF1</i> rs1039244	Allel	transm.	nicht-transm.	Transmissionsrate (%)
242 Trios*	C	121	121	50,00
	G	121	121	50,00
p-Wert	1,00[#]			

*368 (211 weiblich) unabhängige extrem adipöse Kinder und Jugendliche mit einem BMI ≥ 90 . Perzentile (mittlerer BMI 31,82 \pm 6,05 kg/ m², mittleres Alter 13,71 \pm 3,08 Jahre) sowie deren Eltern; [#] McNemar Test (zweiseitig)

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mutationsanalyse im *SOCS-3* Gen

- Durch *in silico* Genanalysen wurde die Genstruktur und der 5' UTR einschließlich des Minimalpromoters mit den Regulationselementen aufgeklärt. Nach PCR-Amplifizierung der codierenden Region sowie des Minimalpromoters erfolgte ein SSCA-Mutationsscreening in einem Kollektiv aus 186 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 188 untergewichtigen Kontrollpersonen
- Im 5' UTR konnten zwei SNPs (-1044C>A und -920C>A) sowie zwei seltene genetische Varianten (-1037T>C und -985G>T) durch Sequenzierung identifiziert und mit Hilfe von PCR-RFLP und Tetra-ARMS-PCR bestätigt werden
- Die Variante -1044C>T wurde in 181 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 278 untergewichtigen Kontrollpersonen mittels PCR-RFLP genotypisiert und ein Assoziationstest durchgeführt ($p = 0,56$). Zusätzlich erfolgte eine Genotypisierung in 703 unabhängigen Trios bzw. Quartetten für eine PDT-Analyse ($p = 0,30$)
- Die Variante -920C>A wurde in 181 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 278 untergewichtigen Kontrollpersonen mittels Tetra-ARMS-PCR genotypisiert und ein Assoziationstest durchgeführt ($p = 0,25$)

Genotypisierung von Varianten in *IRS-1* und *IRS-2*

- Mit Hilfe der frei zugänglichen Datenbanken wurden geeignete Varianten in den Kandidatengenen *IRS-1* und *IRS-2* ausgewählt
- Arg972Gly in *IRS-1* und Gly1057Asp in *IRS-2* wurden in 181 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 278 untergewichtigen Kontrollpersonen mittels PCR-RFLP genotypisiert und ein Test auf Assoziation durchgeführt ($p = 0,43$ bzw. $p = 0,19$)

SNP-Analyse weiterer Kandidatengene des Leptin-Signalweges

- Anhand der aktuellen Literatur und durch *in silico* Genanalysen wurden für plausible Kandidatengene mit nachgewiesener und mutmaßlicher Funktion bei der Regulation bzw. Übermittlung des Leptin-Signals ausgewählt
- Nach bestimmten Kriterien wurden für 20 Kandidatengene insgesamt 29 Datenbank SNPs für die MALDI-TOF MS Genotypisierung in 184 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 184 untergewichtigen Kontrollpersonen ausgewählt
- SNPs mit einem positiven Befund im Assoziationstest wurden für eine TDT-Analyse zusätzlich in 368 Trios genotypisiert

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Kandidatengene der Leptin-Signalkaskade auf ihre Beteiligung an der Körpergewichtsregulation untersucht werden. Da dieser Signalweg zahlreichen Untersuchungen zufolge eine wesentliche Rolle in der Körpergewichtsregulation spielt, wurde untersucht, ob eine genetische Variabilität von Genen dieses Signalsystems an der Entstehung von Adipositas beteiligt ist. Zur konkreten Untersuchung dieser Hypothese auf molekularer Basis wurden plausible Kandidatengene des Signalweges hinsichtlich Sequenzvarianten analysiert. Ziel war es, über eine statistische Korrelation von Markerallelen mit dem Phänotyp Adipositas mögliche Dispositionsgene zu identifizieren.

Im Folgenden sollen zunächst der Kandidatengenansatz sowie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Daten hinsichtlich der Einschätzung ihrer Auswirkung auf die Körpergewichtsregulation und damit auf die Ausprägung des adipösen Phänotyps diskutiert werden. Anschließend folgt eine Beurteilung der statistischen Methoden und der Auswahl der Studienkollektive. Die für die Mutationssuche und SNP-Genotypisierung verwendeten Methoden werden abschließend bewertet.

4.1 Bewertung des Kandidatengenansatzes

Der Kandidatengenansatz hat sich bei der Aufklärung monogen erblicher Krankheiten als außerordentlich erfolgreich erwiesen. Bis heute konnten über 2000 verschiedene Erkrankungen auf Mutationen in jeweils einem Gen zurückgeführt werden (Online Katalog der menschlichen Gene und Erbkrankheiten, *Online Mendelian Inheritance in Man*, OMIM; URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>).

Der Kandidatengenansatz erfordert, dass man über eine klare *a priori* Hypothese im Hinblick auf die Entstehung des Phänotyps verfügt. So wurde die Identifizierung der ursächlichen Gene bei den monogenen Formen der Adipositas beim Menschen (s. Kapitel 1.3.3) über die Erkenntnisse aus Tiermodellen und die spezifischen endokrinologischen Auffälligkeiten erheblich erleichtert. Die quantitativ weitaus bedeutendere „normalen“ Adipositas ist dagegen in der Regel nicht mit weiteren phänotypischen Merkmalen verbunden. Hier liegt, anders als bei den monogen erblichen Krankheiten, deren Phänotyp nahezu ganz durch die Mutation in einem Gen erklärt werden kann, ein Muster disponierender Genotypen zugrunde (s. Kapitel 1.4.1). Daher ist die Identifikation von

Suszeptibilitätsgenen für Adipositas eine außerordentliche methodische und logistische Herausforderung.

Wie für genetisch komplexe Erkrankungen typisch, hat jedes einzelne beteiligte Gen nur eine geringe Auswirkung auf die Merkmalsausprägung. Um einen klinisch relevanten genetischen Beitrag zu identifizieren, müssen daher verschiedene genetische Varianten unterschiedlicher Gene aus diversen biologischen Signalsystemen betrachtet werden. Daraus ergibt sich eine potentiell riesige Anzahl an Genen, die als Kandidatengene in Frage kommen. Auch wenn nach der Entschlüsselung des menschlichen Genoms Lage und Zahl der Gene weitgehend aufgeklärt sind, ist nur für etwa die Hälfte von ihnen die Funktion bekannt. Bei der Suche nach Adipositas-relevanten Genen muss deshalb mit einem hohen Anteil von funktionell bisher nicht aufgeklärten Genen gerechnet werden, und mit Genen, deren Beteiligung an der Körpergewichtsregulation bisher noch unbekannt ist. Aus den genannten Gründen sind die Chancen, Krankheitsgene für komplexe Phänotypen über den Kandidatenansatz identifizieren zu können, kritisch zu sehen (Hebebrand *et al.* 2003; Campbell und Rudan 2002). In den letzten Jahren ist eine große Zahl von Kandidatengenen auf eine Assoziation mit Adipositas und den damit verbundenen Phänotypen untersucht worden (Pérusse *et al.* 2005), jedoch konnte die Mehrheit der veröffentlichten positiven Assoziationsbefunde bislang nicht durch andere Gruppen bestätigt werden.

4.2 Analyse des Kandidatengens SOCS-3

Mehrere Arbeitsgruppen entdeckten unabhängig voneinander eine Klasse von inhibitorischen Proteinen, deren Expression durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone induziert wird. Diese Inhibitoren werden daher als *Suppressor of Cytokine Signaling* (SOCS), *Stat-induced Stat Inhibitors* (SSI) oder *Cytokine inducible SH2-containing Proteins* (CIS, Endo *et al.* 1997; Naka *et al.* 1997, Starr *et al.* 1997) bezeichnet. Bisher konnten 8 Mitglieder dieser Proteinfamilie kloniert werden (CIS und SOCS-1 bis SOCS-7, Hilton *et al.* 1998; Masuhara *et al.* 1997).

Alle SOCS-Proteine zeigen als gemeinsame Strukturmerkmale eine KIR-Domäne (*Kinase Inhibitory Region*), eine ESS-Domäne (*Extended SH2-Subdomain*) sowie ein konserviertes C-terminales Motiv, die SOCS-Box. Über die zentrale SH2-Domäne werden SOCS-Proteine an spezifische phosphorylierte Tyrosinreste verschiedener Signalmoleküle rekrutiert (Schmitz *et al.* 2000). Die ESS-Domäne unterstützt die Bindung von

Phosphotyrosin-Motiven während die KIR-Domäne als Pseudosubstrat die Substratbindestelle der Janus-Kinase besetzt und dadurch deren Funktion hemmt (Sasaki *et al.* 1999). Die Interaktion der SOCS-Box am C-Terminus mit Elongin-C führt zur Ausbildung eines Ubiquitin-Ligase Komplexes und zum Abbau der ubiquitinierten SOCS-Substrate im Proteasom (Zhang *et al.* 2001). Durch diese inhibitorische Wirkung auf Signalmoleküle können SOCS-Proteine als Bestandteil eines klassischen negativen *feedback* Signals betrachtet werden.

Verschiedene Befunde legen eine Funktion von SOCS-3 als negativer *feedback* Regulator der Leptin-Signalkaskade nahe: (1) *SOCS-3* zeigt eine schnelle Induzierbarkeit durch Leptin in hypothalamischen Regionen, die eine hohe Expression des Leptin-Rezeptors (LRb) aufweisen. (2) Eine exogene Gabe von SOCS-3 führt in Zellkulturen zu einer Blockierung der Leptin-Signalübertragung. (3) Tiermodelle mit *SOCS-3 knock-down* Mutationen bzw. einer veränderten SOCS-3 Bindestelle am LRb weisen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Leptin auf (Bjorbaek *et al.* 1998 und 2000).

Mit der Beobachtung erhöhter *SOCS-3* Expression in adipösen leptinresistenten Mäusen kam die Vermutung auf, dass SOCS-3 an der Pathogenese der Leptinresistenz beim Menschen beteiligt sein könnte (Münzberg *et al.* 2004; Bjorbaek *et al.* 1998). Dauerhaft erhöhte Leptinspiegel, wie sie bei Adipositas vorkommen, könnten demnach über erhöhte *SOCS-3* Expression zu einer eingeschränkten Weiterleitung des Leptin-Signals führen (Bjorbaek *et al.* 1998 und 2000; Münzberg *et al.* 2005). Der Versuch diese Hypothese anhand von *SOCS-3* defizienten Tiermodellen zu überprüfen gelang nicht, da sich zeigte, dass homozygote *knock-out* Mäuse (*Socs-3* *-/-*) aufgrund einer Plazentainsuffizienz bereits in der Embryonalperiode sterben (Roberts *et al.* 2001). Eine Möglichkeit, den Einfluss von SOCS-3 auf das Leptin-Signal zu untersuchen, bieten heterozygote *Socs-3* (*+/-*) *knock-out* Mäuse sowie zellspezifische, so genannte konditionale *knock-out* Modelle. Diese Tiermodelle führten zu interessanten Beobachtungen: weder die *Socs-3* (*+/-*) noch die neuronenspezifischen *Socs-3 knock-out* Mäuse zeigen im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistertieren eine Zunahme von Gewicht oder Nahrungsaufnahme wenn ihnen fettreiche Nahrung angeboten wird. Dagegen entwickelten die Wildtyp-Mäuse unter den Versuchsbedingungen eine Insulin-Resistenz sowie eine deutliche Nahrungs- und Gewichtszunahme (Mori *et al.* 2004; Howard *et al.* 2004).

Die Beobachtungen an *SOCS-3* defizienten Tiermodellen implizieren, dass eine reduzierte Expression von *SOCS-3* zu einer erhöhten Ansprechrate auf peripheres Leptin führt, mit der Folge einer stärkeren Appetitsuppression. Umgekehrt könnte demnach eine erhöhte *SOCS-3* Expression zu einer Hemmung leptinvermittelter Signalwege und damit zu Leptinresistenz führen (s. *Abbildung 4-1*).

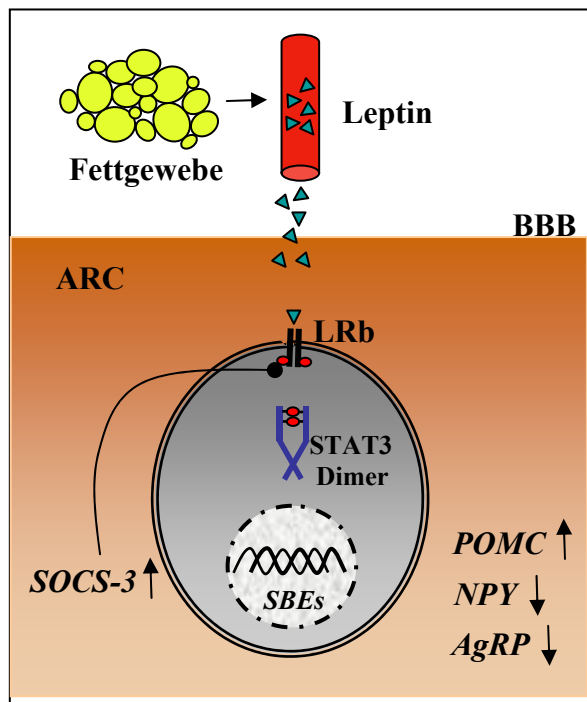


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung des Leptin-Regelkreises. Das Fettgewebshormon Leptin gelangt über die Blut-Hirn-Schranke (BBB) in den Nucleus arcuatus (ARC) des Hypothalamus. Dort bindet Leptin an den Leptin-Rezeptor (LRb) und vermittelt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 die Expression von *POMC* und *SOCS-3*. In der Summe führt dies zu erhöhtem Energieverbrauch und verminderter Nahrungsaufnahme. Der negative *feedback* Inhibitor *SOCS-3* bindet an den Leptin-Rezeptor und hemmt dadurch die Leptin-Signalweiterleitung.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das *SOCS-3* Gen einschließlich des Minimalpromoters unter der Annahme analysiert, dass Sequenzvarianten, die zu funktionellen Veränderungen oder einer veränderten Genexpression führen, Ursache für eine Leptinresistenz und die daraus resultierende Adipositas sein könnten. Dazu wurde zunächst die Genstruktur einschließlich der Promoterregion von *SOCS-3* aufgeklärt. Die entsprechenden Bereiche wurden anschließend in einem systematischen Mutationsscreening hinsichtlich Sequenzvarianten untersucht und die identifizierten Varianten in einem Kollektiv aus extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie untergewichtigen Kontrollpersonen für eine Assoziationsanalyse genotypisiert. Die hierbei erzielten Befunde werden in den nachfolgenden Kapiteln diskutiert.

4.2.1 Genstruktur und Promoter

Neben Sequenzvarianten im codierenden Bereich, die eine veränderter Tertiärstruktur und damit Proteinfunktion zur Folge haben, wurden in der vorliegenden Arbeit auch Varianten in regulatorischen Elementen, die möglicherweise zu einer veränderte Genexpression führen, untersucht. Dazu erfolgte zunächst eine *in silico* Analyse der Genstruktur und des Promoters anhand der frei verfügbaren Informationsquellen (s. *Kapitel 2.2.1*).

Das humane *SOCS-3* Gen ist auf Chromosom 17q25.3 lokalisiert und besteht aus einem Exon von 675 bp Größe (Masuhara *et al.* 1997). Die 5' untranslatierte Region (*Untranslated Region*, UTR) umfasst etwa 1,1 kb strangaufwärts vom Translationsstart (ATG). Diese Region weist einen Guanin-/Cytosin- (GC-) Gehalt von etwa 74% auf (He *et al.* 2003). Der 5'UTR von *SOCS-3* enthält 128 CpG- (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-) Inseln, die einen Anteil von 23% der Sequenz ausmachen (He *et al.* 2003). Durch Promoterstudien konnte ein 128 bp umfassender Bereich im 5'UTR von *SOCS-3* (Position -956 bis -1084¹) identifiziert werden, der für eine maximale Promoteraktivität essentiell ist (He *et al.* 2003). Dieser Minimalpromoter enthält verschiedene Regulationselemente: zwei aufeinander folgende STAT3 Regulationselemente (*STAT Binding Elements*, SBEs) befinden sich 1063 bis 1055 bp (distales SBE) und 1040 bis 1032 bp (proximales SBE) strangaufwärts vom Startcodon ATG. Außerdem konnte eine G/C-reiche Region (1029-1011 bp strangaufwärts vom ATG) und eine TATA-Box (1005 bis 1000 bp strangaufwärts vom ATG) identifiziert werden.

4.2.2 Identifizierte Varianten und Assoziationsergebnisse

In einem systematischen Mutationsscreening wurde der gesamte codierende Bereich des Gens (675 bp) sowie ein 345 bp Fragment im 5'UTR, das den Minimalpromoter enthält, nach Sequenzvarianten untersucht (s. *Kapitel 3.2*). Dabei konnten zwei bereits publizierte SNPs (-920C>A: rs12953258 und -1044C>A) sowie zwei bislang unbekannte seltene Varianten (-1037T>C und -985G>T) identifiziert werden (s. *Abbildung 4-2*). Im codierenden Bereich des Gens konnten keine Sequenzvarianten detektiert werden.

Die identifizierten Varianten sowie die funktionellen Implikationen werden nachfolgend näher beschrieben. Die Diskussion der erzielten Assoziationsbefunde für die jeweiligen Varianten erfolgt in *Kapitel 4.2.3*.

¹ Alle Positionsangaben beziehen sich auf die Referenzsequenz mit dem Datenbankeintrag NC_000017 (NCBI, Stand: August 2005)

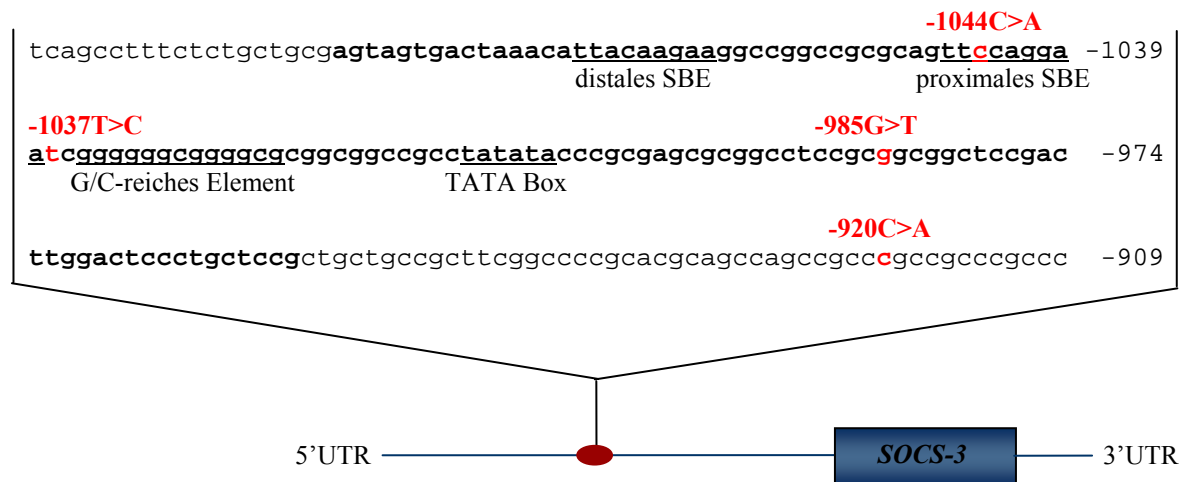


Abbildung 4-2: Identifizierte SNPs und seltene genetische Varianten im Promoterbereich von SOCS-3. Der Minimalpromoter (-956 bis -1084) ist fett gedruckt. Alle Positionsangaben beziehen sich auf die genomische Sequenz des humanen Chromosom 17 (Referenzsequenz mit dem Datenbankeintrag NC_000017 (NCBI, Stand: August 2005).

SOCS-3 -1044C>A

Die -1044C>A Variante wurde bereits von Gylvin und Mitarbeiter (2004) publiziert, die zur Aufklärung des Zusammenhangs von SOCS-3 Polymorphismen und Diabetes mellitus Typ 1 eine Mutationsanalyse des CDS sowie 1000 bp des 5'UTR bei 21 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und 7 jungen gesunden Kontrollpersonen durchführten. Da das A-Allel im untersuchten Kollektiv aus 100 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 mit einer Allelfrequenz von unter 1% vorkam, wurde die Variante in dieser Studie nicht weiter untersucht (Gylvin *et al.* 2004). Unsere Sequenzanalyse zeigte, dass sich -1044C>A im proximalen SBE innerhalb des SOCS-3 Minimalpromoters befindet. Durch den Basenaustausch Cytosin zu Adenin wird der palindromische Aufbau des STAT-Bindemotivs mit der Konsensussequenz TTCN_{2,4}GAA zerstört (TTCCAGGAA zu TTACAGGAA; s. *Abbildung 4-2*). Um Hinweise auf die funktionelle Relevanz dieses Basenaustausches zu erhalten, wurde die Bedeutung des Transkriptionsfaktors STAT3 für die SOCS-3 Genexpression näher untersucht.

Wie *in vitro* Experimente zeigen konnten, sind SBEs im SOCS-3 Promoter notwendig für die Genexpression. Umgekehrt lässt sich die SOCS-3 Expression durch eine dominant-negative Form des STAT3-Proteins inhibieren (Paul *et al.* 2000; Auernhammer *et al.* 1999). Es gibt Hinweise, dass insbesondere das proximale SBE für die Promoteraktivität funktionell von Bedeutung ist. So zeigt eine schrittweise Deletion des 5'UTR von SOCS-3, dass Promotermutanten mit einer Deletion bis -107 bp strangaufwärts der TATA-Box noch auf Interleukin-6 (Il-6) ansprechen, während Deletionen bis -79 strangaufwärts der TATA-

Aufgrund der möglichen funktionellen Konsequenzen von -1044C>A wurde die Variante zusätzlich in unabhängigen Familien, die über ein adiöses Kind ermittelt wurden, genotypisiert (s. *Kapitel 3.2.2*). Dies ermöglichte die Durchführung eines PDT, bei dem Stratifikationseffekte, wie sie bei üblichen Assoziationsstudien auftreten können, nahezu ausgeschlossen sind (s. *Kapitel 4.6*). Die Verteilung der Genotypen zeigte, dass in 1952 Fällen das C-Allel transmittiert und in 1947 Fällen nicht weitervererbt wurde. Für das A-Allel wurden 16 Transmissionen und 21 Nicht-Transmissionen beobachtet. Damit ergab die PDT-Analyse keinen Hinweis auf ein Vererbungsungleichgewicht ($p = 0,30$; s. *Tabelle 3-4*).

SOCS-3 -920C>A

Neben dem -1044C>A Polymorphismus konnte im Mutationsscreening ein Basenaustausch von Cytosin zu Adenin an Position -920 im *SOCS-3* Promoter identifiziert werden (s. *Abbildung 4-2*). Die Variante befindet sich knapp außerhalb des Minimalpromoters (-956 bis -1084 nach He *et al.* 2003). Zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit war die Sequenzvariante in der Datenbank unter der Bezeichnung rs129543258 als unvalidierter SNP registriert (NCBI, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Die Variante wurde ebenfalls im Mutationsscreening von Gylvin und Mitarbeitern (2004) in einem Kollektiv von 100 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 mit einer Allelfrequenz von 8% gefunden. In dieser Studie wiesen homozygote Träger des -920C>A Polymorphismus einen höheren Insulinsensitivitätsindex auf (370 junge gesunde Personen dänischen Ursprungs; $p = 0,03$; Gylvin *et al.* 2004). Demnach könnte der A/A-Genotyp bezüglich der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 protektiv wirken. Diese Vermutung konnte in einer aktuellen Studie, die *SOCS-3* Datenbank-SNPs auf Assoziation mit Adipositas- und Insulinsensitivitätsmarkern untersuchte, nicht bestätigt werden. Hier konnte für die SNPs rs4969169 (+1267 strangabwärts vom ATG), rs12953258 (-920C>A) und rs8064821 (-2215 strangaufwärts vom ATG) bei 2777 weiblichen europäischen Zwillingen keine Assoziation mit Adipositas-assoziierten Phänotypen (BMI, Fettmasse, Körpergewicht) bzw. mit Markern für die Insulinsensitivität (*Homeostasis Model Assessment*, HOMA; *Insulin Sensitivity Measure*, SiM) festgestellt werden (Jamshidi *et al.* 2006).

Durch *in silico* Analysen gibt es Hinweise, dass durch das A-Allel der -920C>A Variante eine AP2 (*Activator Protein 2*) Bindestelle zerstört wird (Gylvin *et al.* 2004). Der Transkriptionsfaktor AP2 spielt u.a. eine Rolle bei der chronischen Inflammation (Mertens

et al. 1998). Dagegen zerstört das häufigere C-Allel eine Bindestelle für ZNF202, einem Transkriptionsrepressor, der im Lipidmetabolismus eine Rolle spielt (Jamshidi *et al.* 2006). Welche funktionellen Auswirkungen der Verlust dieser Bindestellen hat, ist noch nicht geklärt.

Wie bereits beschrieben enthält der Bereich strangaufwärts von *SOCS-3* G/C-reiche Abschnitte, die man als CpG- (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-) Inseln bezeichnet (Ohlsson und Kanduri 2002). Solche CpG-Inseln in 5' Bereichen von Genen sind von großer Bedeutung für die epigenetische Genregulation. So verhindert eine Methylierung der Cytosin-Reste in CpG-Folgen vor einem Gen, dass dieses Gen abgelesen wird, während eine gezielte Demethylierung solche stummgeschalteten Gene wieder reaktivieren kann. Da die Variante -920C>A in einem G/C-reichen Abschnitt des *SOCS-3* Promoters lokalisiert ist (s. *Abbildung 4-2*), könnte der Verlust eines Cytosin-Restes über ein verändertes Methylierungsmuster die *SOCS-3* Genexpression beeinflussen.

Um zu überprüfen, ob -920C>A über eine veränderte *SOCS-3* Expression mit früh manifester Adipositas in Zusammenhang steht, wurde die Variante in 181 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 278 untergewichtigen Kontrollpersonen genotypisiert (s. *Tabelle 1-1*). Die Frequenz des A-Allels betrug in diesem Kollektiv 10,8% (extrem adipöse Kinder und Jugendliche) bzw. 8,3% (untergewichtige Kontrollpersonen). Der Assoziationsansatz lieferte für den -920C>A Polymorphismus im untersuchten Kollektiv keine Assoziation mit dem adipösen Phänotyp ($p = 0,24$; s. *Tabelle 3-3*).

SOCS-3 -1037T>C und -985G>T

Bei -1037T>C und -985G>T handelt es sich um Varianten mit einer Frequenz von unter 1% in den initial untersuchten Studiengruppen. Um seltene genetische Varianten mit Allelfrequenzen unter 1% in Assoziationsanalysen detektieren so können, müssten sie mit einem sehr großen relativen Risiko einhergehen bzw. in einem großen Kollektiv untersucht werden (Tabor *et al.* 2002). Da die *in silico* Analysen der Varianten -1037T>A und -985G>T keinen Hinweis auf funktionelle Relevanz lieferten, wurden sie von weitergehenden Analysen ausgeschlossen.

4.2.3 Zusammenfassende Bewertung der Befunde

Die vorliegende Untersuchung ist die erste bekannte systematische Mutationsanalyse des *SOCS-3* Gens im Zusammenhang mit früh einsetzender Adipositas beim Menschen. Die Assoziationsuntersuchungen von -1044C>A und -920C>A ergaben keinen signifikanten Befund, so dass ein Zusammenhang dieser beiden SNPs im *SOCS-3* Promoter mit Adipositas im untersuchten Studienkollektiv nicht nachgewiesen werden konnte.

Wie in *Kapitel 4* aufgeführt, stellt *SOCS-3* ein biologisch und physiologisch plausibles Kandidatengen im Zusammenhang mit Adipositas dar. Auch die erzielten Kopplungsbefunde zum *SOCS-3* Genlocus (17q25.3) deuten auf einen Zusammenhang mit Adipositas bzw. den damit verbundenen Phänotypen hin (s. *Tabelle 3-1*). Daher ist bei den vorliegenden Ergebnissen die Möglichkeit falsch-negativer Assoziationsbefunde zu diskutieren. Diese können in einer zu kleinen Fallzahl bzw. Allele mit geringer Auswirkung auf den Phänotyp, Populationsstratifikation, genetische Heterogenität aber auch in experimentellen Fehlern begründet sein (s. *Kapitel 4.7*).

Bei der Analyse von -1044C>A und -920C>A wurde mit 181 Fällen und 278 Kontrollen ein vergleichsweise kleines Kollektiv untersucht. Ein möglicher schwacher Effekt der untersuchten Polymorphismen auf den adipösen Phänotyp wäre nur durch Genotypisierung der Varianten in einem großen Kollektiv nachweisbar (Hebebrand *et al.* 2003). Daher wurde die funktionell relevant erscheinende Variante -1044C>A zusätzlich in einer größeren unabhängigen Stichprobe (703 Familien) untersucht. Außerdem ermöglichte die PDT-Analyse, die Problematik einer Populationsstratifikation zu minimieren.

Um einen Einfluss von *SOCS-3* auf die Entstehung von Adipositas definitiv klären zu können, sind weitere Untersuchungen in einem Kollektiv mit deutlich größerer Fallzahl notwendig. Durch funktionelle *in vitro* Studien könnte die Auswirkung der Varianten -920C>A und insbesondere -1044C>A auf die *SOCS-3* Expression analysiert werden.

4.3 Analyse der Kandidatengene *IRS-1* und *IRS-2*

Proteine aus der IRS (*Insulin Receptor Substrates*) -Familie wurden erstmals als Substrate des Insulinrezeptors beschrieben, die durch die Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors phosphoryliert werden und dadurch Signalproteine mit SH2-Domänen rekrutieren (White 1997). Inzwischen ist bekannt, dass Mitglieder der IRS-Familie (*IRS-1* bis 4 und *Gab-1*) als *docking* Proteine zahlreiche verschiedene Rezeptorsysteme mit intrazellulären

Signalkaskaden koppeln. Die Verwendung identischer IRS durch verschiedene Rezeptoren bietet einerseits die Möglichkeit zum *cross-talk* zwischen den Rezeptorsystemen, andererseits wird durch die Interaktion einzelner Rezeptoren mit verschiedenen IRS, die spezifische Signalcharakteristika aufweisen, die Anzahl der regulierbaren Signalwege erhöht (White and Yenush 1998).

Schon seit einiger Zeit wird eine Interaktion zwischen neuronalen Leptin- (Jak/STAT-) und Insulin- (IRS/PI3K-) Signalwegen diskutiert (s. *Kapitel 1.5.3*; Niswender *et al.* 2004). Es wird vermutet, dass beide Signalwege auf Ebene der Insulinrezeptorsubstrate konvergieren und an der Gewichtsregulation und Kontrolle der Glukosehomöostase beteiligt sind. Dieser Zusammenhang wird in *Abbildung 4-4* verdeutlicht. Verschiedene Mausmodelle unterstützten diese Hypothese. So zeigen sowohl neuronenspezifische Insulin- (Brüning *et al.* 2000) als auch Leptin-Rezeptor *knock-out* Mäuse (Cohen *et al.* 2001) im Vergleich zu den Kontrolltieren eine erhöhte Nahrungsaufnahme, höheres Körpergewicht und erhöhte Serumspiegel an Leptin, Insulin und Glukose. Weitere Hinweise auf eine Beteiligung des IRS/PI3K-Signalweges an der Leptin-Wirkung bieten *IRS*-defiziente Mausmodelle. So gleicht der Phänotyp von *Irs-1* (-/-) *knock-out* Mäusen dem metabolischen Syndrom beim Menschen. Die Tiere weisen eine periphere Insulinresistenz, arterielle Hypertonie sowie eine Hypertriglyzerinämie auf. Bei einer durch hochkalorische Ernährung bedingten Adipositas entwickeln diese Tiere Diabetes mellitus (Tamemoto *et al.* 1994). Auch *Irs-2* (-/-) *knock-out* Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren neben anderen Veränderungen eine deutlich erhöhte Nahrungsaufnahme mit daraus resultierender Adipositas. Der gleichzeitig erhöhte Spiegel an zirkulierendem Leptin lässt eine funktionelle Leptinresistenz vermuten (Withers *et al.* 1998).

Insulinsensitivität und weitere metabolische kardiovaskuläre Risikofaktoren (Clausen *et al.* 1995). Aufgrund dieser Beobachtungen erfolgten *in vitro* Studien zur Aufklärung der funktionellen Auswirkung des Aminosäureaustausches von Glycin zu Arginin an Position 972 des IRS-1 Proteins. Hier zeigte sich, dass die veränderte Tertiärstruktur zu einer unvollständigen Interaktion mit der SH2-Bindedomäne der regulatorischen Untereinheit p85 der PI3-Kinase führt, mit der Folge einer reduzierten Aktivität der PI3-Kinase. Diese Beeinträchtigung des IRS1/PI3-K Signalweges scheint für die Entwicklung einer Insulinresistenz verantwortlich zu sein (Porzio *et al.* 1999).

Im Gegensatz dazu gibt es bisher keine Hinweise auf eine Beteiligung von *IRS-2* Polymorphismen an der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 (Almind *et al.* 1999; Bektas *et al.* 1999). Jedoch scheint einer italienischen Studie zufolge Übergewicht das Risiko zu erhöhen, dass der Gly1057Asp Polymorphismus zu Typ 2 Diabetes prädisponiert. So zeigten Personen mit Diabetes mellitus Typ 2 und einem BMI unter 27 kg/m² eine niedrigere Prävalenz des homozygoten Gly1057Asp *IRS-2* Genotyp als vergleichbare glukosetolerante Personen. Dagegen wurde in einer Gruppe mit einem BMI über 27 kg/m² der homozygote Genotyp bei Typ 2 Diabetikern häufiger gefunden als bei glukosetoleranten Personen (Mammarella *et al.* 2000). Ein funktioneller Effekt des Gly1057Asp Polymorphismus auf Insulinsekretion und -sensitivität konnte bislang nicht nachgewiesen werden (Almind *et al.* 1999; Sesti *et al.* 2001).

Die Auswahl der SNPs Arg972Gly in *IRS-1* und Gly1057Asp in *IRS-2* erfolgte unter der Vorstellung, dass diese Sequenzvarianten Auswirkungen auf das Körpergewicht haben könnten. Um einen Zusammenhang der untersuchten Sequenzvarianten mit dem Phänotyp Adipositas zu untersuchen, wurden die Allelverteilungen der Patientengruppe und der untergewichtigen Kontrollgruppe miteinander verglichen. Mit Hilfe eines Assoziationstests wurde überprüft, ob sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Allelfrequenz in beiden Studiengruppen ergeben.

4.3.2 Assoziationsergebnisse

In den untersuchten Studiengruppen konnte keine positive Assoziation der Polymorphismen Arg972Gly in *IRS-1* und Gly1057Asp in *IRS-2* mit Adipositas festgestellt werden. Beide Polymorphismen wurden in einem Kollektiv aus 181 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 278 untergewichtigen Kontrollpersonen genotypisiert (s. *Tabelle 3-5*). Das A-Allel der Arg972Gly Variante in *IRS-1* wurde mit einer Frequenz von 6,1% (extrem adipöse Kinder und Jugendliche) bzw. 7,7% (untergewichtige

Kontrollpersonen) gefunden. Das A-Allel der Gly1057Asp Variante in *IRS-2* wurde mit einer Frequenz von 32,9% (extrem adipöse Kinder und Jugendliche) bzw. 37,2% (untergewichtige Kontrollpersonen) gefunden. Die Assoziationsanalyse ergab einen *p*-Wert von 0,43 (Arg972Gly in *IRS-1*) bzw. 0,19 (Gly1057Asp in *IRS-2*).

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint ein Zusammenhang der untersuchten Polymorphismen mit Adipositas unwahrscheinlich. Dennoch ist auch hier die in *Kapitel 4.2.3* diskutierte Problematik falsch negativer Assoziationsbefunde zu bedenken.

4.4 Strategische SNP-Analyse weiterer Kandidatengene

Eine strategische Analyse von SNPs in Kandidatengenen zur Aufklärung von Krankheitsursachen auf molekularer Ebene ist bei komplexen Phänotypen eine zunehmend populäre Methode (Botstein und Risch 2003; Brookes 1999). Um diese Methode zum Auffinden Adipositas-relevanter SNPs zu etablieren, wurden Kriterien erarbeitet, die eine *in silico* Auswahl möglichst geeigneter bzw. authentischer SNPs aus öffentlich zugänglichen Datenbanken ermöglichen (s. *Kapitel 2.2.2*). Hiefür wurden ausgehend vom Leptin-Signalweg Gene ausgewählt, die als Kandidatengene für Adipositas angesehen werden können. Dazu zählen insbesondere negative Regulatoren des Leptin-Signals wie *PTP1* und *PIAS* sowie verschiedene, für die Signalweiterleitung verantwortliche Moleküle (s. *Kapitel 1.5*). Die ausgearbeitete Strategie zur SNP-Auswahl in diesen Kandidatengenen hatte zum Ziel, möglichst funktionell relevante Sequenzvarianten mit entsprechenden Auswirkungen auf das Körpergewicht auszuwählen. Durch den Einsatz der MALDI-TOF Hochdurchsatz-Genotypisierung konnten die ausgewählten SNPs schnell und effektiv in einer großen Stichprobe auf eine Assoziation mit dem Phänotyp Adipositas untersucht werden.

Die ausgewählten Kandidatengene sowie die erzielten Assoziationsbefunde werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

4.4.1 Kandidatengene und Assoziationsergebnisse

Für insgesamt 20 Kandidatengene wurden nach den in *Kapitel 2.2.2* aufgeführten Kriterien Datenbank-SNPs ausgewählt und auf eine Assoziation mit Adipositas untersucht (s. *Tabelle 3-6*). Die Kandidatengene *AMPK*, *STAT3*, *PIAS* und *PTP1B* erscheinen anhand der aktuellen Literatur am relevantesten im Zusammenhang mit Adipositas. Daher wird auf diese Gene nachfolgend näher eingegangen.

Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase

Die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ist ein heterotrimeres Molekül aus einer katalytischen α -Untereinheit sowie jeweils zwei regulatorischen β - und γ -Untereinheiten. Es existieren verschiedene Isoformen ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1-3$), die von jeweils unterschiedlichen Genen kodiert werden (Carling 2004). Die AMPK spielt eine zentrale Rolle bei der intrazellulären Regulation der Energiebereitstellung. Zelluläre Stressfaktoren wie Hypoglykämie, Ischämie und Hypoxie und die daraus resultierende Erhöhung des Adenosinmonophosphat (AMP)/ Adenosintriphosphat (ATP)- Quotienten bewirken eine Aktivierung der AMPK. Diese wiederum phosphoryliert und aktiviert Schlüsselenzyme in katabolen Signalwegen wie der Fettsäureoxidation und der Glykolyse, die zur Bereitstellung von ATP führen. Gleichzeitig werden energieverbrauchende Prozesse wie die Synthese von Fettsäuren, Triglyzeriden und Cholesterin vorübergehend eingestellt (Kahn *et al.* 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass Leptin die $\alpha 2$ -Isoform AMPK in der Skelettmuskulatur aktiviert und dadurch zu einer gesteigerten mitochondrialen Fettsäureoxidation führt (Minokoshi *et al.* 2002). Über diesen Mechanismus stellt Leptin eine wichtige Verbindung zwischen Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 her. Die bei Adipositas überschüssigen Fettsäuren im Blut werden in Muskel- und Leberzellen gespeichert, welche daraufhin lipotoxisch werden und eine verminderte Insulinsensitivität zeigen (Unger und Orci 2002). Dadurch, dass Leptin in der Skelettmuskulatur den Abbau der Fettsäuren aktiviert, werden die Zellen gewissermaßen „entgiftet“ und reagieren wieder auf Insulin. Versuche an Mäusen, die an Lipodystrophie leiden, konnten diese Beobachtungen bestätigen. Da bei dieser seltenen Krankheit kein Fettgewebe gebildet wird, sammelt sich als Konsequenz Fett in Leber- und Muskelzellen an, welche daraufhin nicht mehr adäquat auf Insulin reagieren. Eine Behandlung dieser Tiere mit Leptin vermindert die Fettansammlung in den Zellen und stellt die Insulinsensitivität wieder her (Asilmaz *et al.* 2004).

Im Hypothalamus steuert die AMPK neueren Untersuchungen zufolge nicht nur den Energiehaushalt von Zellen, sondern den des gesamten Organismus. Hier wird die AMPK von appetithemmenden Faktoren wie Leptin, Insulin und Agonisten am Melanocortin-4 Rezeptor in seiner Aktivität gehemmt, während Faktoren, die einen Energiemangel anzeigen und den Appetit anregen wie Ghrelin und AgRP die Aktivität der AMPK steigern (Andersson *et al.* 2004). Die wichtige Rolle, die AMPK in der Körpergewichtsregulation spielt konnte in Tierversuchen bestätigt werden. So fressen Mäuse mit einer konstitutiv aktiven Variante von AMPK mehr und nehmen rascher an Gewicht zu als unbehandelte

Kontrolltiere. Dagegen nehmen Mäuse mit einer inaktiven AMPK Variante weniger Futter zu sich und bleiben leichter (Minokoshi *et al.* 2004).

Die Beobachtung, dass Mäuseembryonen, denen beide katalytische Untereinheiten der AMPK ($\alpha 1$ und $\alpha 2$) fehlen, bereits am 10. Tag *post conceptionem* sterben, unterstreicht die funktionelle Bedeutung der AMPK (Viollet *et al.* 2003a). Eine selektive Deletion der $\alpha 1$ -Untereinheit führt zu keinem detektierbaren metabolischen Phänotyp, während ein Fehlen der $\alpha 2$ -Untereinheit eine Insulinresistenz in der Skelettmuskulatur sowie eine gestörte Insulinsekretion zur Folge hat (Viollet *et al.* 2003b). Unter fettreicher Ernährung zeigen *AMPK $\alpha 2$ knock-out* Mäuse ein höheres Körpergewicht und Fettmasse im Vergleich zu den Kontrolltieren (Villena *et al.* 2004).

Unter der Vorstellung, dass Sequenzvarianten in der $\alpha 2$ -Untereinheit der AMPK möglicherweise mit Adipositas zusammenhängen, wurde in den verfügbaren Datenbanken validierte SNPs gesucht. Da zu Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit keine validierten SNPs im codierenden Bereich verzeichnet waren, wurden zwei Datenbank-SNPs im Intron von *AMPK $\alpha 2$* (rs1124900 und rs1418442) ausgewählt (s. *Tabelle 3-2*). Auch wenn SNPs im Intronbereich vermutlich keine funktionellen Auswirkungen haben (s. *Tabelle 4-1*), könnten sie dennoch mit funktionellen Varianten im Kopplungsungleichgewicht liegen und dadurch zu einer positiven Assoziation mit dem Phänotyp führen. Mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden beide SNPs im Hochdurchsatzverfahren bei 184 adipösen Kindern und Jugendlichen und 184 untergewichtigen Kontrollpersonen genotypisiert. Der anschließend durchgeführte Assoziationstest ergab für rs1124900 einen *p*-Wert von 0,01 (s. *Tabelle 3-6*) und damit nominell eine statistische Assoziation mit dem Phänotyp Adipositas. Um diesen positiven Befund in einem größeren, unabhängigen Kollektiv zu replizieren, wurden 349 Trios untersucht. Die Analyse der Genotypen ergab, dass in 166 Fällen das G-Allel transmittiert und in 183 Fällen nicht weitervererbt wurde. In den untersuchten Familien lag kein Transmissions-Ungleichgewicht vor (*p* = 0,36; s. *Tabelle 3-7*). Somit konnte die Assoziation nicht bestätigt werden.

Signal Transducers and Activators of Transcription-3

Die Proteine der Familie *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT) stellen Transkriptionsfaktoren dar, die für die Signaltransduktion zahlreicher Zytokine, Hormonen und Wachstumsfaktoren von zentraler Bedeutung sind. Bis heute konnten sieben verschiedene Gene in Säugetierzellen (STAT 1-4, 5a, 5b und 6) identifiziert werden, die STAT-Faktoren kodieren (Levy und Darnell 2002). Die Isoform STAT3

wurde ursprünglich als Mediator der Interleukin-6 (IL-6) -abhängigen Induktion der Akutphase-Proteinsynthese in Hepatozyten entdeckt und ist daher zunächst als *Acute-phase-response Factor* (APRF) bezeichnet worden (Wegenka *et al.* 1993). Inzwischen ist bekannt, dass STAT3 essentieller Mediator aller Zytokinrezeptoren vom IL-6 Typ, zu denen auch der Leptin-Rezeptor zählt, ist. Die Ligandenbindung an diese Rezeptoren führt zur Aktivierung intrazellulär assoziierter JAKs, die wiederum Tyrosinreste im zytoplasmatisch gelegenen Teil des Rezeptors phosphorylieren. Diese Phosphotyrosin-Reste dienen als Bindestellen für STAT3, das über seine SH2-Domäne an den Rezeptor bindet. Das so rekrutierte STAT3 wird an spezifischen Aminosäureresten (Tyr705 und Ser727) phosphoryliert, dissoziiert vom Rezeptor und bildet durch intermolekulare Phosphotyrosin-SH2-Domänen Interaktion Dimere aus (Decker und Kovarik 2000). Die STAT3-Dimere translozieren in den Zellkern, wo sie an *enhancer* Elemente mit der Konsensussequenz TTN₄₋₆AA Elemente binden und die Expression von bestimmten Zielgenen steuern (Ehret *et al.* 2001). Auf diese Weise induziert STAT3 auch die Expression seines eigenen *feedback* Inhibitors SOCS-3, der für die STAT3-Signaltermination sorgt (s. Kapitel 4.2).

Da STAT3 defiziente Mäuseembryonen bereits 7 Tage *post conceptionem* sterben (Takeda *et al.* 1997), ermöglichten erst gewebespezifische *knock-out* Mäuse Einblicke in die biologische Funktion des Transkriptionsfaktors STAT3 (Akira 2000). Diese umfassen diverse biologische Prozesse wie Zellwachstum und -differenzierung, Proliferation, Apoptose, Embryonalentwicklung, Inflammation und Immunregulation (Levy und Darnell 2002). Die Bedeutung von STAT3 und der nachgeschalteten Signalwege für die Gewichtsregulation konnte eindrucksvoll an Tiermodellen demonstriert werden: LRb^{S1138} *knock-in* Mäuse besitzen ein Leptinrezeptor-Gen, in dem Tyr1138 durch ein Serin ausgetauscht wurde (Bates *et al.* 2003). Diese mutierte Rezeptorform verhindert die Signalweiterleitung über den LRb-STAT3 Signalweg, während die STAT3-unabhängigen Signalwege unbeeinträchtigt sind (s. Kapitel 1.5.2). Homozygote LRb^{S1138} Mäuse (*s/s*) zeigen eine beeindruckende Ähnlichkeit mit *diabetes* Mäusen (*db/db*; s. Kapitel 1.3.2). Beide Tiermodelle weisen eine erhöhte Nahrungsaufnahme bei reduziertem Energieverbrauch auf, was in einer massiven frühmanifesten Adipositas resultiert. Die hohen Serumspiegel an zirkulierendem Leptin korrelieren mit der großen Fettmasse der Mäuse und implizieren eine Resistenz gegenüber der Leptin-Wirkung (Bates *et al.* 2003; Cui *et al.* 2004). Allerdings gibt es einen wichtigen Unterschied: während *db/db* Mäuse, denen alle vom LRb ausgehenden Signale fehlen, infertil sind und ein eingeschränktes

Längenwachstum aufweisen, zeigen *s/s* Mäuse eine normale Gonadenfunktion und ein erhöhtes Längenwachstum im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Demnach scheint der LRb-STAT3 Signalweg von zentraler Bedeutung für die Regulation der Energiehomöostase zu sein, während für die hypothalamische Steuerung der Gonadenfunktion und des Längenwachstums andere, bislang unbekannte STAT3-unabhängige Signalwege verantwortlich sind (Bates *et al.* 2003; Cui *et al.* 2004).

In einer Assoziationsanalyse sollte überprüft werden, ob Sequenzvarianten in *STAT3* mit Adipositas zusammenhängen. Da zu Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit keine validierten SNPs im codierenden Bereich verzeichnet waren, wurden 2 Datenbank-SNPs im Intron von *STAT3* (rs2293152 und rs2306581) sowie ein SNP im UTR (rs744166) ausgewählt (s. *Tabelle 3-2*). Mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden beide SNPs im Hochdurchsatzverfahren bei 184 adipösen Kindern und Jugendlichen und 184 untergewichtigen Kontrollpersonen genotypisiert. Der anschließend durchgeführte Assoziationstest ergab keinen Hinweis auf eine Assoziation mit dem Phänotyp Adipositas, da alle *p*-Werte über 0,05 lagen (s. *Tabelle 3-6*).

Protein Inhibitor of Activated STAT

Protein Inhibitor of Activated STAT (PIAS) Moleküle stellen eine wichtige Familie von negativen Regulatoren in Zytokin-Signalwegen dar. Bislang konnten bei Wirbeltieren vier verschiedene PIAS Proteine identifiziert werden: PIAS1, PIAS3 und PIASx mit den beiden Isoformen PIASx α und PIASy. Für PIAS1, PIAS3 und PIASx konnte eine inhibitorische Funktion im Jak/STAT-Signalweg belegt werden. Diese PIAS Moleküle assoziieren über ihren N-terminalen Bereich mit phosphorylierten STAT-Dimeren und inhibieren deren Assoziation mit der DNA. Diese Interaktion ist spezifisch, d.h. PIAS3 assoziiert nur mit STAT3, nicht aber mit STAT1 und umgekehrt (Chung *et al.* 1997; Liu *et al.* 1998). Neuere Forschungsergebnisse geben Hinweise auf den Mechanismus, über den PIAS-Proteine die STAT-Aktivität hemmen. PIAS-Proteine scheinen demnach analog der E3-Ubiquitin Ligase bei der Ubiquitinierung, ein Molekül namens SUMO (*Small Ubiquitine-like Modifier*) auf Lysin-Reste von Zielproteinen übertragen. Durch diesen als Sumoylierung bezeichneten Vorgang werden über noch nicht vollständig geklärte Mechanismen Protein-Protein Interaktionen, subzelluläre Lokalisation von Proteinen und die Gentranskription reguliert (Rogers *et al.* 2003).

Der Datenbank SNP rs1489595 im Intron von *PIAS1* (s. *Tabelle 3-2*) wurde bei 184 adipösen Kindern und Jugendlichen und 184 untergewichtigen Kontrollpersonen

analysiert. Der Assoziationstest ergab einen p -Wert von 0,26 und somit keinen Hinweis auf eine Assoziation mit dem Körpergewicht (s. *Tabelle 3-6*).

Protein Tyrosine Phosphatase 1B

Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen von Proteinen sind an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt. Daher ist es verständlich, dass fehlerhafte Protein-Phosphorylierungen die Entstehung zahlreicher Krankheiten wie Krebs und Diabetes mellitus begünstigen (Hunter 1999). Die Phosphorylierungsschritte werden durch Proteinkinasen katalysiert, während zur Dephosphorylierung Proteinphosphatasen zum Einsatz kommen. Abhängig von ihrer Substratspezifität werden Proteinphosphatasen in Protein-Serin/Threonin- und Protein-Tyrosin-Phosphatasen eingeteilt.

In den Fokus der molekularen Adipositas-Forschung ist die Protein-Tyrosin Phosphatase 1B (PTP1B) gerückt. Auslöser für dieses Interesse war die Entdeckung, dass die Inaktivierung des *PTP1B* Gens in Mäusen eine Resistenz gegen Adipositas verleiht, was möglicherweise auf eine erhöhte Leptinsensitivität zurückzuführen ist (Elchebly *et al.* 1999). Diese Hypothese wird durch Untersuchungen an Zellkulturen gestützt, in denen eine Überexpression von *PTP1B* die Leptin-Signalweiterleitung beeinträchtigt, während in Fibroblasten, denen *PTP1B* fehlt, eine gesteigerte Leptin-Signalweiterleitung aufweisen (Zabolotny *et al.* 2002).

Der nicht validierte Datenbank SNP rs6020571 im Promoterbereich von *PTP1B* (s. *Tabelle 3-2*) stellte sich als monomorph dar. Um einen Zusammenhang von *PTP1B* mit Adipositas zu untersuchen, müsste ein Mutationsscreening durchgeführt werden mit anschließender Genotypisierung der gefundenen Varianten und Assoziationstest in einem entsprechenden Studienkollektiv.

4.4.2 Zusammenfassende Bewertung der Befunde

Ziel der ausgearbeiteten Strategie war, authentische SNPs auszuwählen die nach Möglichkeit funktionell relevant sind und folglich einen entsprechenden Effekt auf das Körpergewicht haben. Im Idealfall sind dies SNPs, welche die Genexpression oder Proteinfunktion beeinflussen, was aber praktisch nicht oder nur schwer vorauszusehen ist. Eine Möglichkeit bot die kritische Auswahl eines SNPs hinsichtlich seiner Position bzw. Typologie (Botstein und Risch 2003; Tabor *et al.* 2002; s. *Tabelle 4-1*). Aus diesem Grund wurden bevorzugt SNPs ausgewählt, die eine Aminosäureaustausch zur Folge haben bzw.

im Promoter lokalisiert sind. Wenn dies nicht möglich war, wurden auch SNPs in anderen Bereichen ausgewählt unter der Vorstellung, dass diese im Kopplungsungleichgewicht mit funktionell relevanten SNPs liegen könnten.

Tabelle 4-1: SNP-Auswahl hinsichtlich Lokalisation und funktionellem Effekt (nach Tabor *et al.* 2002).

Art der Variante	Lokalisation	Funktioneller Effekt	Frequenz im Genom	Prädiktives relatives Risiko
Nonsense	CDS	Vorzeitiger Abbruch der AS-Sequenz	sehr gering	sehr hoch
Missense/ nicht-konservativ	CDS	Austausch zu einer AS mit anderen Eigenschaften	gering	mäßig bis sehr hoch *
Missense/ konservativ	CDS	Austausch zu einer AS mit ähnlichen Eigenschaften	gering	niedrig bis sehr hoch *
Insertionen/ Deletionen (frameshift)	CDS	Rasterschub in der codierenden Region	gering	sehr hoch *
Insertionen/ Deletionen (in frame)	CDS oder nicht-kodierende Sequenz	Veränderung der AS- Sequenz	gering	gering bis sehr hoch
Synonymer Austausch	CDS	Evtl. Beeinflussung des Spleißens	mittel	gering bis hoch
Promoter/ regulatorische Regionen	5'UTR und 3' UTR	Evtl. Beeinflussung von Stärke, Lokalisation und Zeitpunkt der Genexpression	gering bis mittel	gering bis hoch
Spleißstellen/ Exon-Intron Grenzen	Innerhalb 10 bp des Exons	Evtl. Veränderung des Spleißmusters oder der Effektivität der Introns	gering	gering bis hoch
Intron	Innerhalb von Introns	Funktion unbekannt. Evtl. Beeinflussung der Genexpression oder mRNA Stabilität	mittel	sehr gering
Intergenische Region	nicht-kodierende Sequenz zwischen Genen	Funktion unbekannt. Evtl. Beeinflussung der Genexpression durch Enhancer	hoch	sehr gering

*abhängig von der Lokalisation; CDS: codierende Sequenz; UTR: untranslatierter Bereich

Das Hauptkriterium war, bi-allelische SNPs heranzuziehen, die in den Datenbanken als validiert gekennzeichnet sind, d.h. von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt werden konnten. Da man davon ausgeht, dass etwa 15% aller SNPs populationspezifisch sind (Barbujani *et al.* 1997), wurde bei der Auswahl darauf geachtet, dass die SNPs möglichst, entsprechend der Studienkollektive in der vorliegenden Arbeit, in einer kaukasischen Population getestet wurden. Weiterhin wurden nur SNPs mit möglichst hoher Allelfrequenz (Frequenz des seltenen Allels in der Bevölkerung mindestens 20%, optimal 50%) in Betracht gezogen. Die statistische *Power* hängt unter anderem von der Frequenz des interessierenden Allels in der Bevölkerung ab, d.h. SNPs mit sehr niedrigen Allelfrequenzen müssten mit einem sehr großen relativen Risiko einhergehen, um mittels Assoziationsanalysen detektierbar zu

sein. Daher werden für Kandidatengenanalysen Allelfrequenzen von mindestens 5% empfohlen (Tabor *et al.* 2002).

Unter Berücksichtigung dieser Kriterien wurden insgesamt 29 SNPs in 20 Kandidatengen ausgewählt bei 184 adipösen Kindern und Jugendlichen und 184 untergewichtigen Kontrollpersonen genotypisiert (s. *Tabelle 3-2*). Durch die Kooperation mit dem GSF-Forschungszentrum (Professor Dr. T. Meitinger) war es möglich, die ausgewählten SNPs im Hochdurchsatzverfahren via MALDI-TOF Massenspektrometrie zu analysieren. Für eine Assoziationsanalyse wurden 27 SNPs in insgesamt 18 Genen herangezogen (*Tabelle 3-6*). Hiervon zeigten SNPs in den Genen *AMPK α 2* (rs1124900), *FOS* (rs1063169), *PTPN11* (rs2301756) und *RAF1* (rs1039244) *p*-Werte unter 0,1 und wurden daraufhin in 368 Trios analysiert. Im anschließend durchgeführten TDT konnte für keinen SNP der positive Assoziationsbefund bestätigt werden (*Tabelle 3-7*).

Zusammenfassend gab es bei keinem der analysierten Markerallele einen Hinweis auf Assoziation mit dem Phänotyp Adipositas. Mögliche Gründe dafür können genetischer Heterogenität oder zu geringe statistische *Power* sein. Mit 184 Fällen und 184 Kontrollen wurde ein vergleichsweise kleines Kollektiv untersucht. Für zukünftige Untersuchungen wäre wichtig, größere Kollektive zu analysieren, um auch Gene mit kleinem Beitrag identifizieren zu können.

4.5 Auswahl der Studienkollektive

Bei Untersuchungen zu polygenen Erkrankungen ist die Definition und Reproduzierbarkeit des Phänotyps von entscheidender Bedeutung. Daher ist problematisch, dass der Phänotyp Adipositas in verschiedenen Studien unterschiedlich interpretiert wird. So können Probanden über Körpergewicht, Hautfaltendicke, Körperfettgehalt und weiterer assoziierter Kriterien rekrutiert werden. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Studiengruppen wurden anhand des BMI rekrutiert, da dieser ein reproduzierbares und gut zur Adipositas korreliertes Maß darstellt (s. *Kapitel 2.1.1*). Die Verwendung von BMI-Perzentilen stellt zudem eine Auswahl der Probanden als ein Gewichtsextrem aus der umgebenden Population sicher.

Die adipösen Kinder und Jugendlichen wurden in verschiedenen Kliniken Deutschlands, die sich auf die Behandlung von juveniler Adipositas spezialisiert haben, rekrutiert. Für die Aufnahme in die Studiengruppe galten die in *Kapitel 2.1.1* genannten Ein- bzw. Ausschlusskriterien. Die Probanden hatten ein durchschnittliches Alter von 14 Jahren, der

mittlere BMI lag über der 99. Perzentile für Alter und Geschlecht (s. *Tabelle 2-1*). Die Konzentration auf Kinder und Jugendliche basiert auf der Annahme einer stärkeren genetischen Prädisposition bei frühmanifesten gegenüber einer erst im Erwachsenenalter manifest werdenden Adipositas (Pietilainen *et al.* 2001). Zudem wiesen etwa die Hälfte der Väter bzw. Mütter der rekrutierten Probanden ebenfalls eine Adipositas auf. Da die Wahrscheinlichkeit des Fortbestehens von Adipositas bei Kinder und Jugendlichen bis ins Erwachsenenalter sowohl mit dem Ausprägungsgrad als auch mit der elterlichen Belastung steigt, ist die Vorhersagekraft des aktuellen Gewichtes für das Gewicht im Erwachsenenalter als sehr hoch einzustufen (Whitaker *et al.* 1997). Aus diesem Grund eignet sich das verwendete Studienkollektiv besonders gut zur Detektion von genetischen Varianten, die zu frühmanifesten Adipositas prädisponieren.

Die Auswahl der Kontrollgruppe erfolgte unter der Vorstellung, dass diese Personen im Hinblick auf die für die Gewichtsregulation relevanten Allele genetisch maximal divergent von den Probanden mit Adipositas sind. Aus diesem Grund wurden untergewichtige Personen mit einem BMI unterhalb der 15. Perzentile für Alter und Geschlecht rekrutiert (s. *Tabelle 2-1*). Um Essstörungen oder ein restriktives Essverhalten auszuschließen, wurde eine Gewichtsanamnese erhoben und Personen mit Krankheiten oder Verhaltensweisen, die das Körpergewicht beeinflussen könnten, von der Teilnahme an der Studie ausgeschlossen (s. *Kapitel 2.1.1*). Die Zusammenstellung der Kontrollgruppe aus Studierenden mit einem durchschnittlichen Alter von 25 Jahren erfolgte, um auch spät manifest werdende Adipositas oder Essstörungen auszuschließen. Diese Rekrutierungsstrategie bringt jedoch Unterschiede bezüglich Alter, sozialer Herkunft und Bildung mit sich, die zu Scheinassoziationen führen könnten. Um die Möglichkeit solcher falsch-positiver Assoziationen auszuschließen wurde versucht, positive Assoziationsbefunde durch einen TDT zu bestätigen (s. *Kapitel 2.9.2*). Die TDT-Analysen erfolgten in einem unabhängigen Kollektiv, d.h. die adipösen Kinder und Jugendlichen, auf denen die Trios basieren, waren unabhängig von denjenigen, die in die Assoziationsanalysen eingeflossen sind. Für die Probanden der Familienanalysen galten die in *Kapitel 2.1.1* genannten Ein- bzw. Ausschlusskriterien.

4.6 Bewertung der statistischen Methoden

Die Entstehung von Adipositas kann Resultat der Interaktion prädisponierender Genvarianten mit Umweltfaktoren aber auch von Gen-Gen-Interaktionen einzelner

Erbanlagen untereinander sein (s. *Kapitel 1.4.1*). Innerhalb von Familien und Populationen variiert das Ausmaß der Umwelteinflüsse und das Zusammenspiel der Gene, die an Entstehung und Verlauf der Adipositas beteiligt sind. Außerdem treten verstärkt Eigenschaften wie unvollständige Penetranz, Phänokopie, genetische Heterogenität auf. Dieser komplizierte Zusammenhang zwischen Genotyp und Merkmal erschwert die Identifizierung von Dispositionsgenen ebenso, wie dies bei anderen komplexen Krankheiten wie Diabetes mellitus Typ 2 und arterieller Hypertonie der Fall ist.

Die Erfolgsaussichten, relevante Genvarianten zu identifizieren, hängen maßgeblich von der Größe des Einflusses auf den Phänotyp ab. Hypothesenunabhängige genomweite Kopplungsanalysen (*Genom-scans*) bieten eine gute Möglichkeit, Genorte mit großem quantitativem Effekt auf den Phänotyp, so genannte Hauptgenloci, zu identifizieren. Da aber bei komplexen Phänotypen allgemein von vielen genetischen Faktoren mit jeweils geringem Effekt ausgegangen wird, zieht man hier Assoziationsstudien vor (s. *Kapitel 2.9.1*). Diese besitzen im Gegensatz zu Kopplungsstudien ausreichende statistische *Power*, auch Genvarianten mit geringer Auswirkung auf den Phänotyp zu entdecken. Dies liegt vor allem darin begründet, dass nicht verwandte Individuen viel weniger Markerallele teilen als Verwandte und daher gemeinsame Allele unter Betroffenen im Vergleich zu nicht betroffenen Individuen informativer sind (Risch und Merikangas 1996).

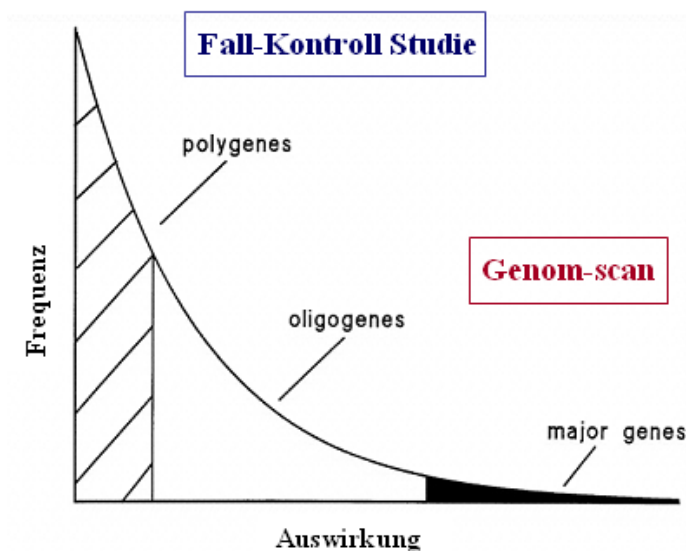


Abbildung 4-5: Polygene Erkrankungen werden von vielen Genen mit unterschiedlichem Einfluss auf den Phänotyp verursacht. Entscheidend für die Identifizierung von Dispositionsgenen sind Frequenz und Effektstärke des relevanten Allels. Gene mit frequenten Polymorphismen, die jeweils einen schwachen Einfluss auf die Varianz des BMI haben (*polygenes*), sind eher in einer Fall-Kontroll Studie im Rahmen des Kandidatengenansatzes erkennbar. In einem *Genom-scan* können dagegen selten vorkommende Genvarianten, die einen starken Einfluss (*major genes*) auf den Phänotyp haben, gefunden werden (modifiziert nach Morton 1998).

Die Identifizierung relevanter Gene durch Assoziationsstudien hängt ganz entscheidend von der Größe der untersuchten Kollektive ab. So sind für Allele mit geringen Effekt bzw. niedriger Allelfrequenz sind große Fallzahlen erforderlich, um eine aussagekräftige statistische Aussage zu treffen (Tabor *et al.* 2002). Bei einem angenommenen relativen

Risiko eines Variantenträgers zwischen 1 und 1,5 wären beispielsweise jeweils Hunderte bis Tausende von Fällen und Kontrollen zu rekrutieren und genotypisieren (Hinney *et al.* 2000; Hebebrand und Hinney 2003). Unter diesen Gesichtspunkten ist in der vorliegenden Arbeit ein vergleichsweise kleines Kollektiv (s. *Tabelle 2-1*) untersucht worden. Daher ist nicht auszuschließen, dass Sequenzvarianten mit sehr geringem Effekt auf den Phänotyp aufgrund mangelnder statistischer Teststärke nicht detektiert werden konnten.

Ein weiterer Nachteil von Assoziationsstudien ist die Anfälligkeit für falsch-positive bzw. falsch-negative Befunde. Diese kommen zustande, wenn sich Personen mit und solche ohne den entsprechenden Phänotyp, die möglicherweise aus genetisch verschiedenen Untergruppen der Bevölkerung stammen, in der Häufigkeit bestimmter Allele unterscheiden (Lander und Schork 1994). Durch diese Populationsstratifikationen kann es rein zufällig zu unterschiedlichen Allelfrequenzen in beiden Kollektiven kommen, die in Wirklichkeit durch Vermischung zweier Subpopulationen entstanden sind. Eine solche Scheinassoziation kann nur durch eine sorgfältige Auswahl der Kontrollgruppen vermindert werden (Hebebrand *et al.* 2003). Die Kontrollpersonen sollten sich möglichst nur in dem zu untersuchenden Merkmal, im vorliegenden Fall dem BMI, von den Personen der Fallgruppe unterscheiden. Diese schwer zu erfüllende Voraussetzung kann mit internen Kontrollen, wie sie der TDT verwendet, umgangen werden (s. *Kapitel 2.9.2*). Da hier jedoch nur heterozygote Elternteile Segregationsinformationen liefern und in die Berechnungen eingehen, wird die Fallzahl drastisch reduziert und schränkt die *Power* des TDT erheblich ein. Dennoch sind anhand dieses Verfahrens Stratifikationseffekte, wie sie bei den üblichen Fall-Kontroll Studien mit externen Kontrollen auftreten können, ausgeschlossen. Aus diesem Grund sollte eine positive Assoziation zum Ausschluss von Stratifikationseffekten unabhängig durch einen TDT bestätigt werden.

4.7 Methodische Fehlerquellen

Entscheidende Grundlage für die Detektion und Genotypisierung von Sequenzvarianten ist die Spezifität der PCR-Reaktion. Diese ist insbesondere von einer effektiven Primerbindung an die Sequenz der Ausgangs-DNA abhängig. Aus diesem Grund wurden die verwendeten Primer nach optimalen Gesichtspunkten ausgewählt (s. *Kapitel 2.4.1*) und die PCR-Reaktion so lange modifiziert, bis eine möglichst hohe Ausbeute des Amplifikates bei einem minimalen Anteil unspezifischer Nebenprodukte erzielt wurde (s. *Kapitel 2.4.3*). Da die PCR ist eine extrem sensitive Methode ist, reichen schon geringste Mengen an

DNA als Amplifikationsvorlage aus. Eine Kontamination mit PCR-Produkten ist besonders problematisch, da hierdurch falsch-positive Amplifikate erzeugt werden können. Um Verunreinigungen mit Fremd-DNA zu vermeiden, wurden so genannte „Vor-“ und „Nach-“ PCR-Bereiche im Labor räumlich getrennt. Dies schloss auch eine Trennung der in den beiden Bereichen verwendeten Geräte und Materialien sowie der Schutzkleidung ein. Zudem wurde in jedem PCR-Ansatz eine Negativkontrolle in Form von *aqua bidest.* anstelle von DNA mitgeführt, um für eine Kontamination mit Fremd-DNA zu kontrollieren. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierdurch konnte die Qualität der Amplifikate beurteilt werden, sowie anhand eines mitgeführten Größenmarkers die korrekte Größe des Amplifikates überprüft werden. Zur Kontrolle, dass das gewünschte DNA-Fragment und nicht etwa ein anderer Bereich des Genoms vervielfältigt worden war, erfolgte eine Sequenzierung des PCR-Produktes mit anschließendem Datenbankabgleich der DNA-Sequenz.

Zur Detektion von Sequenzvarianten in den amplifizierten DNA-Anschnitten wurde die SSCA durchgeführt. Die Sensitivität dieser Methode ist stark von den Versuchsbedingungen abhängig. So beträgt die Erkennungswahrscheinlichkeit von Sequenzveränderungen bei PCR-Produkten bis 250 bp Größe nahezu 100%. Bei größeren Fragmenten liegt die Sensitivität mit 97% bzw. 94% etwas niedriger (Sheffield *et al.* 1993). Durch eine Analyse bei zwei unterschiedlichen Temperaturen kann die Sensitivität der SSCA erhöht werden (Orita *et al.* 1989). Das gescreente *SOCS-3* Promoterfragment liegt mit 345 bp im akzeptablen Größenbereich zur Mutationsdetektion (s. *Tabelle 2-5*). Die beiden Fragmente *SOCS-3-3d* und *SOCS-3-3* wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten, um optimale Größen zu erhalten (s. *Tabelle 2-6*). Um eine größtmögliche Sensitivität zu erreichen, wurde das *SOCS-3* Mutationsscreening bei Raumtemperatur und bei 4°C durchgeführt. Auf jedem SSCA-Gel wurde eine Negativkontrolle mit *aqua bidest.* anstelle von DNA mitgeführt, um Kontaminationen mit Fremd-DNA auszuschließen. Die Sequenzveränderungen in DNA-Proben mit einem abweichenden SSCA-Muster wurden durch eine Sequenzanalyse spezifiziert. Es fand stets eine bidirektionale Sequenzierung statt, um vor allem heterozygote Mutationen identifizieren zu können. Bei nicht eindeutigen Ergebnissen wurde die Sequenzierung wiederholt.

Infolge der fehlenden 3'→5' Exonuklease Aktivität der *Taq*-Polymerase beträgt selbst unter optimalen Reaktionsbedingungen die Fehlerrate 8×10^{-6} (Cline *et al.* 1996). Dies bedeutet, dass während der Amplifikation eines 350 bp Fragmentes statistisch gesehen etwa zwei Nukleotide falsch eingebaut werden. Solche fehlerhaft eingebauten Basen

können in der SSCA irrtümlich als Sequenzvariante detektiert werden. Um solche Polymerasefehler auszuschließen, wurde bei Proben mit abweichendem SSCA-Muster die PCR und SSCA-Analyse wiederholt. Zusätzlich wurden alle neu identifizierten Sequenzvarianten durch alternative Methoden wie die Sequenzierung, RFLP oder Tetra-ARMS-PCR verifiziert, um Polymerasefehler ausschließen zu können.

Die Genotypisierung der neu identifizierten bzw. der Datenbank-SNPs erfolgte mittels PCR-RFLP und Tetra-ARMS-PCR (s. *Kapitel 2.7* und *2.7.2*). Bei der Bestimmung der Genotypen ist eine möglichst geringe Fehlerrate von entscheidender Bedeutung für nachfolgende Assoziationsstudien. So kann bei Varianten mit niedriger Allelfrequenz schon eine geringe Anzahl falsch bestimmter Genotypen zur Annahme einer „falschen“ Assoziation bzw. zum Nicht-Auffinden einer vorhandenen Assoziation führen. Um diese Fehlerquelle soweit wie möglich zu minimieren, wurde stets eine zweite, unabhängige Auswertung der Versuchsergebnisse durch einen erfahrenen Mitarbeiter bzw. eine erfahrene Mitarbeiterin durchgeführt. Zusätzlich erleichterte das Mitführen von DNA-Proben mit bekannten Genotypen auf jedem Gel die korrekte Detektion der Allele.

Eine weitere Kontrolle der Genauigkeit der ermittelten Genotypen ermöglichte im Fall des -1044C>A SNPs die durchgeführte TDT-Analyse. Diese ermöglichte zusätzlich zur Überprüfung einer Assoziation der Allele mit Adipositas eine Kontrolle, ob die Genotypen der adipösen Kinder und Jugendlichen korrekt ermittelt worden sind. Für den TDT wurden zusätzlich zu den adipösen Indexprobanden jeweils beide Eltern genotypisiert, deren Allele entsprechend den Mendelschen Regeln verteilt sein mussten. Falls die erfassten Allele von Kindern und deren Eltern nicht zusammenpassten, konnte eine Wiederholung der Genotypisierung einen eventuell ungenau ausgewerteten Genotyp oder in vereinzelten Fällen einen nicht zum Kind passenden Vater aufdecken. Bei unklarer Vaterschaft flossen die betreffenden Familien nicht in die Analysen ein.

Durch die Kooperation mit dem GSF-Forschungszentrum (Professor Dr. T. Meitinger) war es möglich, die ausgewählten Datenbank-SNPs weiterer Kandidatengene im Hochdurchsatzverfahren via MALDI-TOF Massenspektrometrie zu analysieren zu analysieren. Diese Methode erlaubte eine schnelle, zuverlässige und qualitativ hochwertige Genotypisierung der ausgewählten SNPs.

5 Zusammenfassung

In den vergangenen Jahrzehnten haben sich Übergewicht und Adipositas epidemisch ausgebreitet. Vor allem der Anteil adipöser Kinder und Jugendlicher nimmt weltweit stetig zu. Der Anstieg der Adipositasprävalenz begründet sich in einem veränderten Ernährungs- und Bewegungsverhalten auf der Grundlage einer genetischen Prädisposition zu Adipositas. Das Ziel moderner Adipositas-Forschung ist daher die Identifizierung von Genen, die über eine Beeinflussung des Ernährungs- und Bewegungsverhaltens sowie der Energiehomöostase an der Regulation des Körperwichts beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Relevanz von *SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling)-3*, einem negativen *feedback* Inhibitor in der Leptin-Signalkaskade, im Zusammenhang mit Leptinresistenz und daraus resultierender Adipositas untersucht. In einem systematischen Mutationsscreening wurden codierender Bereich sowie Minimalpromoter des *SOCS-3*-Gens bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen analysiert. Im Bereich des Minimalpromoters konnten neben seltenen genetischen Varianten (-1037T>C und -985G>T) zwei *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs; -1044C>A und -920C>A) identifiziert werden. Die -1044 Variante befindet sich in einem funktionell bedeutsamen DNA-Bindeelement und wurde daher in umfangreichen und unabhängigen Studiengruppen mit adipösen Kindern und Jugendlichen sowie untergewichtigen erwachsenen Kontrollpersonen genotypisiert.

Da die Insulinrezeptorsubstrate *IRS-1* und *IRS-2* eine wichtige Verbindung zwischen Leptin- und Insulin-Signalweg herstellen, wurden SNPs aus öffentlichen Datenbanken ausgewählt um einen Zusammenhang dieser Kandidatengene mit frühmanifesten Adipositas zu untersuchen. Durch den Einsatz der MALDI-TOF Hochdurchsatz-Genotypisierung war es zudem möglich, 29 SNPs in insgesamt 20 weiteren Kandidatengenen der Leptin-Signalkaskade schnell und effektiv in einer großen Stichprobe zu untersuchen.

Alle SNPs wurden in Studiengruppen mit adipösen Kindern und Jugendlichen sowie untergewichtigen erwachsenen Kontrollpersonen genotypisiert. Zusammenfassend lassen die Daten keinen Zusammenhang von Sequenzvarianten in den beschriebenen Genen mit Adipositas unter der Annahme eines besonderen genetischen und/oder Umwelt-Hintergrundes erkennen.

6 Literaturverzeichnis

1. Ahima, R.S., Flier, J.S. (2000): Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* 62, 413-437.
2. Akira, S. (2000): Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* 19, 2607-2611.
3. Almind, K., Frederiksen, S.K., Bernal, D., Hansen, T., Ambye, L., Urhammer, S., Ekstrom, C.T., Berglund, L., Reneland, R., Lithell, H., White, M.F., Van Obberghen, E., Pedersen, O. (1999): Search for variants of the gene-promoter and the potential phosphotyrosine encoding sequence of the insulin receptor substrate-2 gene: evaluation of their relation with alterations in insulin secretion and insulin sensitivity. *Diabetologia* 42, 1244-1249.
4. Almind, K., Bjorbaek, C., Vestergaard, H., Hansen, T., Echwald, S., Pedersen, O. (1993): Amino acid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 342, 828-832.
5. Anand, B.K., Brobeck, J.K. (1951): Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J. Biol. Med.* 24, 123-140.
6. Andersson, U., Filipsson, K., Abbott, C.R., Woods, A., Smith, K., Bloom, S.R., Carling, D., Small, C.J. (2004): AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J. Biol. Chem.* 279, 12005-12008.
7. Asilmaz, E., Cohen, P., Miyazaki, M., Dobrzyn, P., Ueki, K., Fayzikhodjaeva, G., Soukas, A.A., Kahn, C.R., Ntambi, J.M., Socci, N.D., Friedman, J.M. (2004): Site and mechanism of leptin action in a rodent form of congenital lipodystrophy. *J. Clin. Invest.* 113, 414-424.
8. Auernhammer, C.J., Bousquet, C., Melmed, S. (1999): Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6964-6969.
9. Banks, A.S., Davis, S.M., Bates, S.H., Myers, M.G. Jr (2000): Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 14563-14572.
10. Banks, W.A., DiPalma, C.R., Farrell, C.L. (1999): Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. *Peptides* 20, 1341-1345.
11. Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B., Maness, L.M. (1996): Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17, 305-311.
12. Barbujani, G., Magagni, A., Minch, E., Cavalli-Sforza, L.L. (1997): An apportionment of human DNA diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4516-4519.
13. Barsh, G.S., Schwartz, M.W. (2002): Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat. Rev. Genet.* 3, 589-600.

14. Barsh, G.S., Farooqi, I.S., O'Rahilly, S. (2000): Genetics of body weight regulation. *Nature* 404, 644-651.
15. Bates, S.H., Myers, M.G. Jr. (2003): The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 447-452.
16. Bates, S.H., Stearns, W.H., Schubert, M., Tso, A.W.K., Wang, Y., Banks, A.S., Dundon, T.A., Lavery, H.J., Haq, A.K., Maratos-Flier, E., Neel, B.G., Schwartz, M.W., Myers, M.G. Jr. (2003): STAT3 signaling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 421, 856-859.
17. Bazan, J.F. (1989): A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 788-795.
18. Bektas, A., Warram, J.H., White, M.F., Krolewski, A.S., Doria, A. (1999): Exclusion of insulin receptor substrate 2 (IRS-2) as a major locus for early-onset autosomal dominant type 2 diabetes. *Diabetes* 48, 640-642.
19. Bjorbaek, C., Buchholz, R.M., Davis, S.M., Bates, S.H., Pierroz, D.D., Gu, H., Neel, B.G., Myers, M.G. Jr., Flier, J.S. (2001): Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 4747-4755.
20. Bjorbaek, C., Lavery, H.J., Bates, S.H., Olson, R.K., Davis, S.M., Flier, J.S., Myers, M.G. Jr. (2000): SOCS-3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J. Biol. Chem.* 275, 40649-40657.
21. Bjorbaek, C., Elmquist, J.K., Frantz, J.D., Shoelson, S.E., Flier, J.S. (1998): Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol. Cell* 1, 619-625.
22. Böddeker, I., Ziegler, A. (2000): Assoziations- und Kopplungsstudien zur Analyse von Kandidatengen. *Dtsch. Med. Wschr.* 125, 810-815.
23. Böhm, A., Friese, E., Greil, H., Lüdecke, K. (2002): Körperliche Entwicklung und Übergewicht bei Kindern und Jugendlichen: Eine Analyse von Daten aus ärztlichen Reihenuntersuchungen des öffentlichen Gesundheitsdienstes im Land Brandenburg. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 150, 48-57.
24. Botstein, D., Risch, N. (2003): Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat. Genet.* 33, 228-237.
25. Bray, G.A. (2000): Afferent signals regulating food intake. *Proc. Nutr. Soc.* 50, 373-384.
26. Brookes, A.J. (1999): The essence of SNPs. *Gene* 234, 177-186.
27. Brüning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P.C., Klein, R., Krone, W., Müller-Wieland, D., Kahn, C.R. (2000): Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289, 2122-2125.

28. Budowle, B., Chakraborty, R., Giusti, A.M., Eisenberg, A.J., Allen, R.C. (1991): Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am. J. Hum. Genet.* 48, 137-144.
29. Bultmann, S.J., Michaud, E.J., Woychik, R.P. (1992): Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 71, 1195-1204.
30. Campbell, H., Rudan, I. (2002): Interpretation of genetic association studies in complex disease. *Pharmacogenomics J.* 2, 349-360.
31. Cardon, L.R., Bell, J.I. (2001): Association study designs for complex diseases. *Nat. Rev. Genet.* 2, 91-99.
32. Carling, D. (2004): AMPK. *Curr. Biol.* 14, R220.
33. Caro, J.F., Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Opentanova, I., Goldman, W.H., Lynn, R.B., Zhang, P.L., Sinha, M.K., Considine, R.V. (1996): Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348, 159-161.
34. Carpenter, L.R., Farruggella, T.J., Symes, A., Karow, M.L., Yancopoulos, G.D., Stahl, N. (1998): Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with Ob receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6061-6066.
35. Challis, B.G., Pritchard, L.E., Creemers, J.W., Delplanque, J., Keogh, J.M., Luan, J., Wareham, N.J., Yeo, G.S., Bhattacharyya, S., Froguel, P., White, A., Farooqi, I.S., O'Rahilly, S. (2002): A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1997-2004.
36. Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A., Woolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Culpepper, J., Moore, K.J., Breitbart, R.E., Duyk, G.M., Tepper, R.I., Morgenstern, J.P. (1996): Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84, 491-495.
37. Chua, S.C. Jr., Chung, W.K., Wu-Peng, X.S., Zhang, Y., Liu, S.M., Tartaglia, L.A., Leibel, R.L. (1996): Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 271, 994-996.
38. Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., Shuai, K. (1997): Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803-1805.
39. Clausen, J.O., Hansen, T., Bjorbaek, C., Echwald, S.M., Urhammer, S.A., Rasmussen, S., Andersen, C.B., Hansen, L., Almind, K., Winther, K. et al. (1995): Insulin resistance: interactions between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1. *Lancet* 346, 397-402.

40. Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gormelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.M., Basdevant, A., Bougneres, P., Lebouc, Y., Froguel, P., Guy-Grand, B. (1998): A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392, 398-401.
41. Cline, J., Braman, J.C., Hogrefe, H.H. (1996): PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acid Res.* 24, 3546-3551.
42. Cohen, P., Zhao, C., Cai, X., Montez, J.M., Rohani S.C., Feinstein, P., Mombaerts, P., Friedman, J.M. (2001): Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J. Clin. Invest.* 108, 11113-11121.
43. Coleman, D.L. (1973): Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 9, 294-298.
44. Cone, R.D., Lu, D., Koppula, S., Vage, D.I., Klungland, H., Boston, B., Chen, W., Orth, D.N., Pouton, C., Kesterson, R.A. (1996): The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog. Horm. Res.* 51, 287-317.
45. Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannessian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L. et al. (1996): Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Eng. J. Med.* 334, 292-295.
46. Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschop, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., Garcia-Segura, L.M., Nillni, E.A., Mendez, P., Low, M.J., Sotonyi, P., Friedman, J.M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W.F., Cone, R.D., Horvath, T.L. (2003): The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 649-661.
47. Cruz, M.L., Goran, M.I. (2004): The metabolic syndrome in children and adolescents. *Curr. Diab. Rep.* 4, 53-62.
48. Cui, Y., Huang, L., Eleftheriou, F., Yang, G., Shelton, J.M., Giles, J.E., Oz, O.K., Pourbahrami, T., Lu, C.Y., Richardson, J.A., Karsenty, G., Li, C. (2004): Essential role of STAT3 in body weight and glucose homeostasis. *Mol. Cell Biol.* 24, 258-69.
49. Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., Weigle, D.S. (2001): A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714-1719.
50. Decker, T., Kovarik, P. (2000): Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19, 2628-2637.
51. Dietz, W.H., Robinson, T.N. (1998): Use of the body mass index (BMI) as a measure of overweight in children and adolescents. *J. Pediatr.* 132, 191-193.
52. Doerge, R.W. (2002): Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat. Rev. Genet.* 3, 43-52.

53. Donahue, L.R., Beamer, W.G. (1993): Growth hormone deficiency in 'little' mice results in aberrant body composition, reduced insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3), but does not affect IGFBP-2, -1 or -4. *J Endocrinol.* 136, 91-104.
54. Duggan, J.P., Booth, D.A. (1986): Obesity, overeating, and rapid gastric emptying in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Science* 231, 609-611.
55. Dunn, S.L., Bjornholm, M., Bates, S.H., Chen, Z., Seifert, M., Myers, M.G. Jr. (2005): Feedback inhibition of leptin receptor/Jak2 signaling via Tyr1138 of the leptin receptor and suppressor of cytokine signaling 3. *Mol. Endocrinol.* 19, 925-938.
56. Ebbeling, C.B., Pawlak, D.B., Ludwig, D.S. (2002): Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure. *Lancet* 360, 473-482.
57. Ehrling, C., Haussinger, D., Bode, J.G. (2005): Sp3 is involved in the regulation of SOCS3 gene expression. *Biochem. J.* 387, 737-745.
58. Ehret, G.B., Reichenbach, P., Schindler, U., Horvath, C.M., Fritz, S., Nabholz, M., Bucher, P. (2001): DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *J. Biol. Chem.* 276, 6675-6688.
59. Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.C., Ramachandran, C., Gresser, M.J., Tremblay, M.L., Kennedy, B.P. (1999): Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283, 1544-1548.
60. Endo, T.A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiya, S., Yoshimura, A. (1997): A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387, 921-924.
61. Erickson, J.C., Hollopeter, G., Palmiter, R.D. (1996): Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* 274, 1704-1707.
62. Ewens, W.J., Spielman, R.S. (1995): The transmission/disequilibrium test: history, subdivision, and admixture. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 455-464.
63. Faivre, L., Cormier-Daire, V., Lapierre, J.M., et al. (2002): Deletion of the SIM1 gene (6q16.2) in a patient with a Prader-Willi-like phenotype. *J. Med. Genet.* 39, 594-596.
64. Farooqi, I.S., Keogh, J.M., Yeo, G.S., Lank, E.J., Cheetham, T., O'Rahilly, S. (2003): Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N. Engl. J. Med.* 348, 1085-1095.

65. Farooqi, I.S., Matarese, G., Lord, G.M., Keogh, J.M., Lawrence, E., Agwu, C., Sanna, V., Jebb, S.A., Perna, F., Fontana, S., Lechler, R.I., Depaoli, A.M., O'Rahilly, S. (2002): Beneficial effects of leptin on obesity, T-cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J. Clin. Invest.* 110, 1093-1103.
66. Farooqi, I.S., Yeo, G.S., Keogh, J.M., Aminian, S., Jebb, S.A., Butler, G., Cheetham, T., O'Rahilly, S. (2000): Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J. Clin. Invest.* 106, 271-279.
67. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH; Prentice AM; Hughes IA; McCamish MA; O'Rahilly S: Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Eng J Med* 1999; 341, 879-84.
68. Fredriks, A.M., van Buuren, S., Wit, J.M., Verloove-Vanhorick, S.P. (2000): Body index measurements in 1996-7 compared with 1980. *Arch. Dis. Child.* 82, 107-112.
69. Friedman, J.M., Halaas, J.L. (1998): Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770.
70. Funakoshi, A., Miyasaka, K., Shinozaki, H., Masuda, M., Kawanami, T., Takata, Y., Kono, A. (1995): An animal model of congenital defect of gene expression of cholecystokinin (CCK)-A receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 787-796.
71. Fujisawa, T., Ikegami, H., Kawaguchi, Y., Ogihara, T. (1998): Meta-analysis of the association of Trp64Arg polymorphism of beta 3-adrenergic receptor gene with body mass index. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 2441-2444.
72. Gauderman, W.J. (2003): Candidate gene association analysis for a quantitative trait, using parentoffspring trios. *Genet. Epidemiol.* 25, 327-338.
73. Ge, H., Huang, L., Pourbahrami, T., Li, C. (2002): Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 277, 45898-45903.
74. Geller, F., Reichwald, K., Dempfle, A., Illig, T., Vollmert, C., Herpertz, S., Siffert, W., Platzer, M., Hess, C., Gudermann, T., Biebermann, H., Wichmann, H.E., Schafer, H., Hinney, A., Hebebrand, J. (2004): Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 572-581.
75. Gibbs, J., Smith, G.P. (1986): Satiety: the roles of peptides from the stomach and the intestine. *Fed. Proc.* 45, 1391-1395.
76. Gibbs, J., Young, R.C., Smith, G.P. (1973): Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 84: 488-495.
77. Gray, D.S. (1989): Diagnosis and prevalence of obesity. *Med. Clin. North. Am.* 73, 1-13.

78. Gunn, T.M., Miller, K.A., He, L., Hyman, R.W., Davis, R.W., Azarani, A., Schlossman, S.F., Duke-Cohan, J.S., Barsh, G.S. (1999): The mouse mahogany locus encodes a transmembrane form of human attractin. *Nature* 398, 152-156.
79. Gura, T (1999): Obesity research. Leptin not impressive in clinical trial. *Science* 286, 881-882.
80. Gylvin, T., Nolsoe, R., Hansen, T., Nielsen, E.M.D., Berghold, R., Karlsen, A.E., Billestrup, N., Borch-Johnson, K., Pedersen, O., Mandrup-Poulsen, T., Nerup, J., Pociot, F. (2004): Mutation analysis of suppressor of cytokine signalling 3, a candidate gene in Type 1 Diabetes and insulin sensitivity. *Diabetologia* 47, 1273-1277.
81. Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., Friedman, J.M. (1995): Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269, 543-546.
82. He, B., You, L., Uematsu, K., Matsangou, M., Xu, Z., He, M., McCormick, F., Jablons, D.M. (2003): Cloning and characterization of a functional promoter of the human SOCS-3 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 386-391.
83. Hebebrand, J., Wermter, A.K., Hinney, A. (2004): Genetik und Gen-Umwelt-Interaktion. In: Wabitsch, M. (Hrsg.): *Adipositas bei Kindern und Jugendlichen. Grundlagen und Klinik*, S. 28-36. Berlin: Springer-Verlag.
84. Hebebrand, J., Dabrock, P., Lingenfelder, M., Mand, E., Rief, W., Voit, W. (2004): Ist Adipositas eine Krankheit? Interdisziplinäre Perspektiven. *Dtsch. Arztebl.* 101, 2468-2474.
85. Hebebrand, J., Friedel, S., Schäuble, N., Geller, F., Hinney, A. (2003): Perspectives: molecular genetic research in human obesity. *Obes. Rev.* 4, 139-146.
86. Hebebrand, J., Hinney, A. (2003): Genetics of eating disorders. In: Medeiros-Neto, G., Hlapern, A., Bouchard, C. (Eds.): *Progress in Obesity Research Vol. 9*, S. 307-312. UK: Esher, Surrey: John Libbey Eurotext Limited.
87. Hebebrand, J., Hinney, A., Oeffner, F. (2001): Molekulare Grundlagen der Adipositas. In: Ganten, D., Ruckpaul, K. (Hrsg.): *Molekularmedizinische Grundlagen von Endokrinopathien*, S. 387-426. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
88. Hebebrand, J., Wulftange, H., Georg, T., Ziegler, A., Hinney, A., Barth, N., Mayer, H., Remschmidt, H. (2000): Epidemic obesity: are genetic factors involved via increased rates of assortative mating? *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24, 345-353.
89. Hebebrand, J., Hinney, A., Roth, H., Ziegler, A. (1998): Genetische Aspekte der Adipositas. In: Wechsler, J.G. (Hrsg.): *Adipositas/Ursachen und Therapie*, S. 105-117. Berlin, Wien: Ex Libris Roche-Blackwell.
90. Hebebrand, J., Remschmidt, H. (1995): Das Körpergewicht unter genetischen Aspekten. *Med. Klin.* 90, 403-410.

91. Hebebrand, J., Hesecker, H., Himmelmann, G.W., Schäfer, H., Remschmidt, H. (1994): Altersperzentilen für den Body Mass Index aus Daten der Nationalen Verzehrsstudie einschließlich einer Übersicht zu relevanten Einflussfaktoren. *Akt. Ernährungsmed.* 19, 259-265.
92. Hegyi, K., Fulop, K., Kovacs, K., Toth, S., Falus, A. (2004): Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell. Biol. Int.* 28, 159-169.
93. Heid, I.M., Vollmert, C., Hinney, A., Doring, A., Geller, F., Lowel, H., Wichmann, H.E., Illig, T., Hebebrand, J., Kronenberg, F., KORA Group (2005): Association of the 103I MC4R allele with decreased body mass in 7937 participants of two population based surveys. *J. Med. Genet.* 42, e21.
94. Hilton, D.J., Richardson, R.T., Alexander, W.S., Viney, E.M., Willson, T.A., Sprigg, N.S., Starr, R., Nicholson, S.E., Metcalf, D., Nicola, N.A. (1998): Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 114-119.
95. Hinney, A., Bettecken, T., Tarnow, P., Brumm, H., Reichwald, K., Lichtner, P., Scherag, A., Nguyen, T.T., Schlumberger, P., Rief, W., Vollmert, C., Illig, T., Wichmann, H.E., Schafer, H., Platzer, M., Biebermann, H., Meitinger, T., Hebebrand, J. (2006): Prevalence, Spectrum and Functional Characterization of Melanocortin-4 Receptor Gene Mutations in a Representative Population-based Sample and Obese Adults from Germany. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 1761-1769.
96. Hinney, A., Hohmann, S., Geller, F., Vogel, C., Wermter, A.K., Brokamp, B., Goldschmidt, H., Siegfried, W., Remschmidt, H., Schafer, H., Gudermann, T., Hebebrand, J. (2003): Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 4258-4267.
97. Hinney, A., Remschmidt, H., Hebebrand, J. (2000): Candidate gene polymorphisms in eating disorders. *Eur. J. Pharmacol.* 410, 147-159.
98. Hinney, A., Schmidt, A., Nottebom, K., Heilbult, O., Becker, I., Ziegler, A., Gerber, G., Sina, M., Gorg, T., Mayer, H., Siegfried, W., Fichter, M., Remschmidt, H., Hebebrand, J. (1999): Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 1483-1486.
99. Hinney, A., Lentjes, K.U., Rosenkranz, K., Barth, N., Roth, H., Ziegler, A., Hennighausen, K., Coners, H., Wurmser, H., Jacob, K., Romer, G., Winnikes, U., Mayer, H., Herzog, W., Lehmkuhl, G., Poustka, F., Schmidt, M.H., Blum, W.F., Pirke, K.M., Schafer, H., Grzeschik, K.H., Remschmidt, H., Hebebrand, J. (1997): Beta 3-adrenergic-receptor allele distributions in children, adolescents and young adults with obesity, underweight or anorexia nervosa. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 21, 224-230.
100. Hofbauer, K.G. (2002): Pathophysiologie der Adipositas: Moleküle, Mechanismen, Modelle. *Swiss Med. Forum* 40, 937-944.

101. Holder, J.L. Jr., Butte, N.F., Zinn, A.R. (2000): Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum. Mol. Genet.* 9: 101-108.
102. Howard, J.K., Cave, B.J., Oksanen, L.J., Tzameli, I., Bjorbaek, C., Flier, J.S. (2004): Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat. Med.* 10, 734-738.
103. Hulens, M., Beunen, G., Claessens, A.L., Lefevre, J., Thomis, M., Philippaerts, R., Borms, J., Vrijens, J., Lysens, R., Vansant, G. (2001): Trends in BMI among Belgian children, adolescents and adults from 1969 to 1996. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25, 395-399.
104. Hung, T., Mak, K., Fong, K. (1990): A specificity enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 18, 4953.
105. Hunter, T. (1998-99): The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease. *Harvey Lect.* 94, 81-119.
106. Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., Smith, F.J., Campfield, L.A., Burn, P., Lee, F. (1997): Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88, 131-141.
107. Iwasaki, N., Cox, N.J., Wang, Y.Q., Schwarz, P.E., Bell, G.I., Honda, M., Imura, M., Ogata, M., Saito, M., Kamatani, N., Iwamoto, Y. (2003): Mapping genes influencing type 2 diabetes risk and BMI in Japanese subjects. *Diabetes* 52, 209-213.
108. Jackson, R.S., Creemers, J.W., Farooqi, I.S., et al. (2003): Small intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J. Clin. Invest.* 112, 1550-1560.
109. Jackson, R.S., Creemers, J.W., Ohagi, S., Raffin-Sanson, M.L., Sanders, L., Montague, C.T., Hutton, J.C., O'Rahilly, S. (1997): Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat. Genet.* 16, 303-306.
110. Jamshidi, Y., Snieder, H., Wang, X., Spector, T.D., Carter, N.D., O'dell, S.D. (2006): Common polymorphisms in SOCS3 are not associated with body weight, insulin sensitivity or lipid profile in normal female twins. *Diabetologia* 10, 1-5.
111. Jolliffe, D. (2004): Extent of overweight among US children and adolescents from 1971 to 2000. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28, 4-9.
112. Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., Hardie, D.G. (2005): AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell. Metab.* 1, 15-25.

113. Kapeller, R., Moriarty, A., Strauss, A., Stubdal, H., Theriault, K., Siebert, E., Chickering, T., Morgenstern, J.P., Tartaglia, L.A., Lillie, J. (1999): Tyrosine phosphorylation of tub and its association with Src homology 2 domain-containing proteins implicate tub in intracellular signalling by insulin. *J. Biol. Chem.* 274, 24980-24986.
114. Keller, E., Gausche, R., Meigen, C., Keller, A., Burmeister, J., Kiess, W. (2002): Auxological computer based network for early detection of disorders of growth and weight attainment. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 15, 149-156.
115. Kennedy, G.C. (1953): The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc. R. Soc. Lond.* 140, 579-592.
116. Kiess, W., Galler, A., Reich, A., Muller, G., Kapellen, T., Deutscher, J., Raile, K., Kratzsch, J. (2001): Clinical aspects of obesity in childhood and adolescence. *Obes. Rev.* 2, 29-36.
117. Killeen, J., Vanderburg, D., Harlan, W.R. (1978): Application of weight-height ratios and body indices to juvenile populations-the National Health Examination Survey Data. *J. Chronic Dis.* 31, 529-537.
118. Kopelman, P.G. (2000): Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635-643.
119. Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N. et al. (1998): Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393, 72-76.
120. Kromeyer-Hauschild, K., Wabitsch, M., Kunze, D., Geller, F., Geiß, H.C., Hesse, V., von Hippel, A., Jaeger, U., Johnson, D., Kiess, W., Korte, W., Kunze, D., Menner, K., Müller, M., Niemann-Pilatus, A., Remer, T., Schaefer, F., Wittchen, H.U., Zabransky, S., Zellner, K., Hebebrand, J. (2001): Perzentile für den Body Mass Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 149, 807-818.
121. Kromeyer-Hauschild, K., Zellner, K., Jaeger, U., Hoyer, H. (1999): Prevalence of overweight and obesity among school children in Jena (Germany). *Int. J. Obes. Relat. Metab. Dis.* 23, 1143-1150.
122. Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., Grüters, A. (1998): Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat. Genet.* 19, 155-157.
123. Lander, E.S. (1996): The new genomics: global views of biology. *Science* 274, 536-539.
124. Lander, E.S., Schork, N.J. (1994): Genetic dissection of complex traits. *Science* 265, 2037-2048.
125. Landesinstitut für den öffentlichen Gesundheitsdienst NRW (2003): Dokumentation der schulärztlichen Untersuchungen. LÖGD, Bielefeld.

126. Levy, D.E., Darnell, J.E. Jr. (2002) : Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 651-662.
127. Lindsay, R.S., Kobes, S., Knowler, W.C., Bennett, P.H., Hanson, R.L. (2001): Genome-wide linkage analysis assessing parent-of-origin effects in the inheritance of type 2 diabetes and BMI in Pima Indians. *Diabetes* 50, 2850-2857.
128. Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D., Shuai, K. (1998): Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10626-10631.
129. Livingstone, M.B., Robson, P.J., McCarthy, S., Kiely, M., Harrington, K., Browne, P., Galvin, M., Wareham, N.J., Rennie, K.L. (2001): Physical activity patterns in a nationally representative sample of adults in Ireland. *Public Health Nutr.* 4, 1107-1116.
130. Lohmueller, K.E., Pearce, C.L., Pike, M., Lander, E.S., Hirschhorn, J.N. (2003): Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat. Genet.* 33, 177-182.
131. Mammarella, S., Romano, F., Di Valerio, A., Creati, B., Esposito, D.L., Palmirotta, R., Capani, F., Vitullo, P., Volpe, G., Battista, P., Della Loggia, F., Mariani-Costantini, R., Cama, A. (2000): Interaction between the G1057D variant of IRS-2 and overweight in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2517-2521.
132. Maes, H.H., Neale, M.C., Eaves, L.J. (1997): Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav. Genet.* 27, 325-351.
133. Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., Kern, P.A., Friedman, J.M. (1995): Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Med.* 1, 1155-1161.
134. Martin, E.R., Monks, S.A., Warren, L.L., Kaplan, N.L. (2000): A Test for Linkage and Association in General Pedigrees: The Pedigree Disequilibrium Test. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 146-154.
135. Martin, R.B., Kaplan, N.L., Weir, B.S. (1997): Tests for linkage and association in nuclear families. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 439-448.
136. Masuhara, M., Sakamoto, H., Matsumoto, A., Suzuki, R., Yusukawa, H., Mitsui, K., Wakioka, T., Tanimura, S., Sasaki, A., Misawa, H., Yokouchi, M., Ohtsubo, M., Yoshimura, A. (1997): Cloning and characterization of novel CIS family genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 439-446.
137. Matsuoka, T., Tahara, M., Yokoi, T., Masumoto, N., Takeda, T., Yamaguchi, M., Tasaka, K., Kurachi, H., Murata, Y. (1999): Tyrosine phosphorylation of STAT3 by leptin through leptin receptor in mouse metaphase 2 stage oocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 480-484.

138. Mayer, H., Wabitsch, M. (2003): Comorbidity of childhood obesity. The Murnau Study. *MMW Fortschr. Med.* 145, 30-34.
139. McMinn, J.E., Baskin, D.G., Schwartz, M.W. (2000): Neuroendocrine mechanisms regulating food intake and body weight. *Obes. Rev.* 1, 37-46.
140. Mertens, P.R., Alfonso-Jaume, M.A., Steinmann, K., Lovett, D.H. (1998): A synergistic interaction of transcription factors AP2 and YB-1 regulates gelatinase A enhancer-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 273, 32957-32965.
141. Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids Res.* 16, 1215-1218.
142. Mizuno, T.M., Kleopoulos, S.P., Bergen, H.T., Roberts, J.L., Priest, C.A., Mobbs, C.V. (1998): Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 47: 294-7.
143. Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Foufelle, F., Ferre, P., Birnbaum, M.J., Stuck, B.J., Kahn, B.B. (2004): AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428, 569-574.
144. Minokoshi, Y., Kim, Y.B., Peroni, O.D., Fryer, L.G., Muller, C., Carling, D., Kahn, B.B. (2002): Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415, 339-343.
145. Moll, P.P., Burns, T.L., Lauer, R.M. (1991): The genetic and environmental sources of body mass index variability: The Muscatine Ponderosity Family Study. *Am. J. Hum. Genet.* 49, 1243-1255.
146. Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Seweter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., Cheetham, C.H., Earley, A.R., Barnett, A.H., Prins, J.B., O'Rahilly, S. (1997): Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387, 903-908.
147. Mori, H., Hanada, R., Hanada, T., Aki, D., Mashima, R., Nishinakamura, H., Torisu, T., Chien, K.R., Yasukawa, H., Yoshimura, A. (2004): Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat. Med.* 10, 739-743
148. Morton, N.E. (1998): Significance levels in complex inheritance. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 690-697.
149. Mountjoy, K., Mortrud, M., Low, M., Simerly, R., Cone, R. (1994): Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocr.* 8, 1298-1308.
150. Münzberg, H., Björnholm, M., Bates, S.H., Myers, M.G. Jr. (2005): Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 642-652.

151. Münzberg, H., Flier, J.S., Bjorbaek, C. (2004): Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 145, 4880-4889.
152. Naggert, J.K., Fricker, L.D., Varlamov, O., Nishina, P.M., Rouille, Y., Steiner, D.F., Carroll, R.J., Paigen, B.J., Leiter, E.H. (1995): Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat. Genet.* 10, 135-142.
153. Nagle, D.L., McGrail, S.H., Vitale, J., Woolf, E.A., Dussault, B.J., DiRocco, L., Holmgren, L., Montagno, J., Bork, P., Huszar, D., Fairchild-Huntress, V., Ge, P., Keiltry, J., Ebeling, C., Baldini, L., Gilchrist, J., Burn, P., Carlson, G.A., Moore, K.J. (1999): The mahogany protein is a receptor involved in suppression of obesity. *Nature* 398, 148-152.
154. Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S., Kishimoto, T. (1997): Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387, 924-929.
155. Neel, J.V. (1962): Diabetes mellitus: A "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am. J. Hum. Genet.* 14, 353-362.
156. Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J.C., Markham, A.F. (1989): Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 17, 2503-2516.
157. Niswender, K.D., Baskin, D.G., Schwartz, M.W. (2004): Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 362-369.
158. Noben-Trauth, K., Naggert, J.K., North, M.A., Nishina, P.M. (1996): A candidate gene for the mouse mutation *tubby*. *Nature* 380, 534-538.
159. Norman, R.A., Thompson, D.B., Foroud, T., Garvey, W.T., Bennett, P.H., Bogardus, C., Ravussin, E. (1997): Genomewide search for genes influencing percent body fat in Pima Indians: suggestive linkage at chromosome 11q21-q22. Pima Diabetes Gene Group. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 166-173.
160. O'Connell, J.R., Weeks, D.E. (1998): PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 259-266.
161. Ohlsson, R., Kanduri, C. (2002): New twists on the epigenetics of CpG islands. *Genome Res.* 12: 525-526.
162. Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., Barsh, G.S. (1997): Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278, 135-138.

163. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, K., Hayashi, K., Sekiya, T. (1989): Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 2766-2770.
164. Ott, J. (1989): Statistical properties of the haplotype relative risk. *Genet. Epidemiol.* 6, 127-130.
165. Paul, C., Seiliez, I., Thissen, J.P., Le Cam, A. (2000): Regulation of expression of the rat SOCS-3 gene in hepatocytes by growth hormone, interleukin-6 and glucocorticoids mRNA analysis and promoter characterization. *Eur. J. Biochem.* 267, 5849-5857.
166. Pérusse, L., Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y.C., Weisnagel, S.J., Argyropoulos, G., Walts, B., Snyder, E.E., Bouchard, C. (2005): The human obesity gene map: the 2004 update. *Obes. Res.* 13, 381-490.
167. Pérusse, L., Rice, T., Chagnon, Y.C., Despres, J.P., Lemieux, S., Roy, S., Lacaille, M., Ho-Kim, M.A., Chagnon, M., Province, M.A., Rao, D.C., Bouchard, C. (2001): A genome-wide scan for abdominal fat assessed by computed tomography in the Quebec Family Study. *Diabetes* 50, 614-621.
168. Peterfy, M., Phan, J., Xu, P., Reue, K. (2001): Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat. Genet.* 27, 121-124.
169. Pietiläinen, K.H., Kaprio, J., Rasanen, M., Winter, T., Rissanen, A., Rose, R.J. (2001): Tracking of body size from birth to late adolescence: contributions of birth length, birth weight, duration of gestation, parents' body size, and twinship. *Am. J. Epidemiol.* 154, 21-29.
170. Porzio, O., Federici, M., Hribal, M.L., Lauro, D., Accili, D., Lauro, R., Borboni, P., Sesti, G. (1999): The Gly972Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic β -cells. *J. Clin. Invest.* 104, 357-364.
171. Pritchard, J.K. (2001): Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases? *Am. J. Hum. Genet.* 69, 124-137.
172. Qian, S., Chen, H., Weingarth, D., Trumbauer, M.E., Novi, D.E., Guan, X., Yu, H., Shen, Z., Feng, Y., Frazier, E., Chen, A., Camacho, R.E., Shearman, L.P., Gopal-Truter, S., MacNeil, D.J., Van der Ploeg, L.H., Marsh, D.J. (2002): Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5027-5035.
173. Reaven, G.M. (2003): Insulin resistance/compensatory hyperinsulinemia, essential hypertension, and cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 2399-2403.
174. Risch, N., Merikangas, K. (1996): The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273, 1516-1517.

175. Roberts, A.W., Robb, L., Rakar, S., Hartley, L., Cluse, L., Nicola, N.A., Metcalf, D., Hilton, D.J., Alexander, W.S. (2001): Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98, 9324-9329.
176. Robinson, S.W., Dinulescu, D.M., Cone, R.D. (2000): Genetic models of obesity and energy balance in the mouse. *Annu. Rev. Genet.* 34, 687-745.
177. Rogers, R.S., Horvath, C.M., Matunis, M.J. (2003): SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *J. Biol. Chem.* 278, 30091-30097.
178. Rozen, S., Skaletsky, H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365-386.
179. Rychlik, W. (1993): Selection of primers for polymerase chain reaction. *In*: White, B.A. (Eds.): *PCR-Protocols, Current methods and applications*, S. 31-40. Totowa New Jersey: Humana press.
180. Sanger, F.S., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74, 5463-5467.
181. Sarkar, G., Kapelner, S., Sommer, S.S. (1990): Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res.* 18, 7465.
182. Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S., Syoda, T., Kinjyo, I., Sasaki, M., Johnston, J.A., Yoshimura, A. (1999): Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells* 4, 339-351.
183. Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P.C., Schaper, F. (2000): SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J. Biol. Chem.* 275, 12848-12856.
184. Schwartz, M.W., Woods, S.C. Porte, D., Seeley, R.J., Baskin, D.G. (2000): Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671.
185. Schwartz, M.W., Sipols, A.J., Marks, J.L., Sanacora, G., White, J.D., Scheurink, A., Kahn, S.E., Baskin, D.G., Woods, S.C., Figlewicz, D.P. et al. (1992): Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130, 3608-3616.
186. Sesti, G., Federici, M., Hribal, M.L., Lauro, D., Sbraccia, P., Lauro, R. (2001): Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J.* 15, 2099-2111.
187. Shaffer, J.P. (1995): Multiple hypothesis testing. *Ann. Rev. Psych.* 46, 561-576.
188. Sheffield, V.C., Beck, J.S., Kwitek, A.F., Sandstrom, D.W., Stone, E.M. (1993): The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16, 325-332.

189. Shutter, J.R., Graham, M., Kinsey, A.C., Scully, S., Luthy, R., Stark, K.L. (1997): Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev.* 11, 593-602.
190. Sigal, R.J., Doria, A., Warram, J.H., Krolewski, A.S. (1996): Codon 972 Polymorphism in the insulin receptor substrate-1 gene, obesity, and risk of noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 1657-1659.
191. Sina, M., Hinney, A., Ziegler, A., Neupert, T., Mayer, H., Siegfried, W., Blum, W.F., Remschmidt, H., Hebebrand, J. (1999): Phenotypes in three pedigrees with autosomal dominant obesity caused by haploinsufficiency mutations in the melanocortin-4 receptor gene. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 1501-1507.
192. Smith, G.P., Jerome, C., Cusin, B.J., Eterno, R., Simansky, K.J. (1981): Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat. *Science* 213, 1036-1037.
193. Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G.D., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J., Neel, B.G., Birge, R.B., Fajardo, J.E., Chou, M.M., Hanafusa, H., Schaffhausen, B., Cantley, L.C. (1993): SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72, 767-778.
194. Spielman, R.C., McGinnis, R.E., Ewens, W.J. (1993): Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am. J. Hum. Genet.* 52, 506-516.
195. Stanley, B.G., Kyrkouli, S.E., Lampert, S., Leibowitz, S.F. (1986): Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7, 1189-1192.
196. Starr, R., Willson, T.A., Viney, E.M., Murray, L.J., Rayner, J.R., Jenkins, B.J. et al. (1997): A family of cytokine inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, 917-921.
197. Stellar, E. (1954): The physiology of motivation. *Psychol. Rev.* 61, 5-22.
198. Storm, N., Darnhofer-Patel, B., van den Boom, D., Rodi, C.P. (2003): MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. *Methods Mol. Biol.* 212, 241-262.
199. Strobel, A., Issad, T., Camoin, L., Ozata, M., Strosberg, A.D. (1998): A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat. Genet.* 18, 213-215.
200. Stunkard, A.J., Harris, J.R., Pedersen, N.L., McClearn, G.E. (1990): The body-mass index of twins who have been reared apart. *N. Engl. J. Med.* 322, 1483-1487.
201. Stunkard, A.J., Sorensen, T.I., Hanis, C., Teasdale, T.W., Chakraborty, R., Schull, W.J., Schulsinger, F. (1986): An adoption study of human obesity. *N. Eng. J. Med.* 314, 193-198.

202. Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J.M., Araki, E., Wilden, P.A., Cahill, D.A., Goldstein, B.J., White, M.F. (1991): Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352, 73-77.
203. Sun, X.J., Wang, L.M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers, M.G. Jr., Glasheen, E., Lane, W.S., Pierce, J.H., White, M.F. (1995): Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377, 173-177.
204. Tabor, H.K., Risch, N.J., Myers, R.M. (2002): Opinion: Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat. Rev. Genet.* 3, 391-397.
205. Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., Akira, S. (1997): Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3801-3804.
206. Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S. (1994): Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372, 182-186.
207. Tartaglia, L.A. (1997): The leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 6093-6096.
208. Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richrads, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J. et al. (1995): Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263-1271.
209. Terwilliger, J.D., Ott, J. (1992): A haplotype-based 'haplotype relative risk' approach to detecting allelic associations. *Hum. Hered.* 42, 337-346.
210. Troiano, R.P., Flegal, K.M. (1998): Overweight children and adolescents: description, epidemiology, and demographics. *Pediatrics* 101, 497-504.
211. Tschöp, M., Heiman, M.L. (2001): Rodent obesity models: an overview. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 109, 307-319.
212. Tschöp, M., Smiley, D.L., Heiman, M.L. (2000): Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908-913.
213. Unger, R.H., Orci, L. (2002): Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 202-212.
214. Vaisse, C., Clement, K., Durand, E., Hercberg, S., Guy-Grand, B., Froguel, P. (2000): Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J. Clin. Invest.* 106, 253-262.
215. Vaisse, C., Clement, K., Guy-Grand, B., Froguel, P. (1998): A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat. Genet.* 20, 113-114.

216. Villena, J.A., Viollet, B., Andreelli, F., Kahn, A., Vaulont, S., Sul, H.S. (2004): Induced adiposity and adipocyte hypertrophy in mice lacking the AMP-activated protein kinase- α 2 subunit. *Diabetes* 53, 2242-2249.
217. Viollet, B., Andreelli, F., Jorgensen, S.B., Perrin, C., Flamez, D., Mu, J., Wojtaszewski, J.F., Schuit, F.C., Birnbaum, M., Richter, E., Burcelin, R., Vaulont, S. (2003a): Physiological role of AMP-activated protein kinase (AMPK): insights from knockout mouse models. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 216-219.
218. Viollet, B., Andreelli, F., Jorgensen, S.B., Perrin, C., Geloën, A., Flamez, D., Mu, J., Lenzner, C., Baud, O., Bennoun, M., Gomas, E., Nicolas, G., Wojtaszewski, J.F., Kahn, A., Carling, D., Schuit, F.C., Birnbaum, M.J., Richter, E.A., Burcelin, R., Vaulont, S. (2003b): The AMP-activated protein kinase α 2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* 111, 91-98.
219. Wabitsch, M. (2004): Kinder und Jugendliche mit Adipositas in Deutschland. Aufruf zum Handeln. *Bundesgesundheitsblatt* 47 H.3, 2251-2256.
220. Wabitsch, M. (2000): Overweight and obesity in European children: definition and diagnostic procedures, risk factors and consequences for later health outcome. *Eur. J. Pediatr.* 159, 8-13.
221. Watson, P.E., Watson, I.D., Batt, R.D. (1979): Obesity indices. *Am. J. Clin. Nutr.* 32, 736-737.
222. Wegenka, U.M., Buschmann, J., Luttkien, C., Heinrich, P.C., Horn, F. (1993): Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol. Cell. Biol.* 13, 276-288.
223. Whitaker, R.C., Wright, J.A., Pepe, M.S., Seidel, K.D., Dietz, W.H. (1997): Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N. Eng. J. Med.* 337, 869-873.
224. White, M.F. (2003): Insulin signaling in health and disease. *Science* 302, 1710-1711.
225. White, M.F., Yenush, L. (1998): The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 228, 179-208.
226. White, D.W., Kuropatwinski, K.K., Devos, R., Baumann, H., Tartaglia, L.A. (1997): Leptin receptor (OB-R) signaling. *J. Biol. Chem.* 272, 4065-4071.
227. White, M.F. (1997): The insulin signaling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40, 2-17.
228. WHO (2001): *Lancet* 357.
229. WHO (1998): Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. WHO technical support series 894.

230. Wigginton, J.E., Cutler, D.J., Abecasis, G.R. (2005): A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 887-893.
231. Wilson, B.D., Ollmann, M.M., Kang, L., Stoffel, M., Bell, G.I., Barsh, G.S. (1995): Structure and function of ASP, the human homolog of the mouse agouti gene. *Hum. Mol. Genet.* 4, 223-230.
232. Withers, D.J., Gutierrez, J.S., Towery, H., Burks, D.J., Ren, J.M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G.I., Bonner-Weir, S., White, M.F. (1998): Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391, 900-904.
233. Yasukawa, H., Sasaki, A., Yoshimura, A. (2000): Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 143-164.
234. Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M.B., Hochgeschwender, U. (1999): Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat. Med.* 5, 1066-1070.
235. Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A.R., Day, I.N. (2001): An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Res.* 29, 88.
236. Yeo, G.S., Lank, E.J., Farooqi, I.S., Keogh, J., Challis, B.G., O'Rahilly, S. (2003): Mutations in the human melanocortin-4 receptor gene associated with severe familial obesity disrupts receptor function through multiple molecular mechanisms. *Hum. Mol. Genet.* 12, 561-574.
237. Yeo, G.S., Farooqi, I.S., Aminian, S., Halsall, D.J., Stanhope, R.G., O'Rahilly, S. (1998): A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat. Genet.* 20, 111-112.
238. Yoshimura, A. (2005): Negative regulation of cytokine signaling. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 28, 205-220.
239. Zabolotny, J.M., Bence-Hanulec, K.K., Stricker-Krongrad, A., Haj, F., Wang, Y., Minokoshi, Y., Kim, Y.B., Elmquist, J.K., Tartaglia, L.A., Kahn, B.B., Neel, B.G. (2002): PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev. Cell.* 2, 489-495.
240. Zhang, J.G., Metcalf, D., Rakar, S., Asimakis, M., Greenhalgh, C.J., Willson, T.A., Starr, R., Nicholson, S.E., Carter, W., Alexander, W.S., Hilton, D.J., Nicola, N.A. (2001): The SOCS box of suppressor of cytokine signaling-1 is important for inhibition of cytokine action in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13261-13265.
241. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432
242. Ziegler, A. (1999): Sampling strategies for model free linkage analyses of quantitative traits: implications for sib pair studies of reading and spelling disabilities to minimize the total study cost. *Eur. Child. Adolesc. Psychiatry* 8, 35-39.

7 Anhang

DNA- und Proteinsequenzen

Genomische Struktur des *SOCS-3* Gens

Ausschnitt aus der Referenzsequenz mit dem Datenbankeintrag NC_000017 (NCBI, Stand: August 2005). Die Nummerierung richtet sich nach dem Translationsstart ATG. Der Minimalpromoter ist kursiv dargestellt, die beschriebenen Regulationselemente im Promoter sind grau unterlegt, die Sequenz der verwendeten Primer ist unterstrichen.

SOCS-3 prom for →

...ccgcctcggccgcctcctcgtcgcgcctttgtctccgcgcgcgtccctcccggtccctg -1159
 cccctgctcgcggcccgccctcggcgncccgcgccccctccctcaccctccgcgcctcagc -1099

SOCS-3 -920 outer for → **SBE** **SBE**

ctttctctgctgcgagtagtgactaaacattacaagaaggccggccgcgcagttccagga -1039

GC-Box **TATA-Box**

atcggggggcgggcgcgggcggccgcctatatacccgcgagcgcggcctccgcggcggct -979

SOCS-3 -920 inner for →

ccgacttggactccctgctccgctgctgccgcttcggccccgcacgcagccagccgccag -919

← **SOCS-3 -920 inner rev** ← **SOCS-3 prom rev**

ccgccgcgccgcagctcccgcgcggcccccttgccgcgggtccctctcctggtccct -859

cccggttgggtccgggggtgcgcagggggcagggcgggcgcccaggggaagctcgagggac -799

← **SOCS-3 -920 outer rev**

gcgcgcgcgaaggctcctttgtggacttcacggccgcgaacatctgggcgcagcgcgggc -739
 caccgctggcgtctcgcgcgcgctgccttggggacccgagggggctcagccccaagg -679
 acggagacttcgattcgggaccaggtaggaaggaggagcgcggcgtggggaggggtctcg -619
 ctgagtcgccggagcttttccgggtttccctcccttcccggtcattcccggcagggga -559
 ggtgacgaggtaggggcagagcggatggaagccggagatccaggttccggaataactcc -499
 ggctggggccttcgggcttctcctgtcccctccctacccccgtgcctcgggtttctccct -439
 ccgtccacaccgccccggggtactggactgagcggcgcccaggcagtcgccgggggcctt -379
 ctctgctccccaccggccacactcctggagacctaacttccgcgcgcgagtttccac -319
 gctgcgccttgtagtgccgcctgggaaggggctgccggggccaccctgccggcaggg -259
 gcgggagccgtgcgggctccgtgaggcgcctggatcgagcgcgggccaggagagggcc -199
 cccggggcagtggggtgccccagtcgctcggcgaaggcaggggagccggggcgggccgggc -139

-Sequenz wird auf der nächsten Seite fortgesetzt-

-Fortsetzung der Sequenz-

SOCS-3 3d for →

gcgctggagggg	<u>ttccgggcactcaacgcgctcgcgcccttctctccgcagccccccggga</u>	-79
tgcggtagcggccgctgtg	cgaggccgcgaagcagctgcagccgcccgcgcgagatcc	-19
acgctggctccgtgcgcc	ATGGTCACCCACAGCAAGTTTCCCGCCGCCGGGATGAGCCGC	42
	M V T H S K F P A A G M S R	14
CCCCTGGACACCAGCCTGCGCCTCAAGACCTTCAGCTCCAAGAGCGAGTACCAGCTGGTG		102
P L D T S L R L K T F S S K S E Y Q L V		34
GTGAACGCAGTGC	GCAAGCTGCAGGAGAGCGGCTTCTACTGGAGCGCAGTGACCGGCGGC	162
V N A V R K L Q E S G F Y W S A V T G G		54
GAGGCGAACCTGCTGCTCAGTGCCGAGCCCGCCGGCACCTTTCTGATCCGCGACAGCTCG		222
E A N L L L S A E P A G T F L I R D S S		74

SOCS-3 3 for →

GACCAGCGCCACTTCTTCACGCTCAGCGTCAAGACCC	<u>AGTCTGGGACCAAGAACCTGCGC</u>	282
D Q R H F F T L S V K T Q S G T K N L R		94
ATCCAGTGTGAGGGGGGAGCCTTCTCTCTGAGAGCGATCCCCGGAGCACGCAGCCCGTG		342
I Q C E G G S F S L Q S D P R S T Q P V		114

← SOCS-3 3d rev

CCCCGCTTC	<u>GACTGCGTGCTCAAGCTGGTGCACCACTACATGCCGCCCCCTGGAGCCCCC</u>	402
P R F D C V L K L V H H Y M P P P G A P		134
TCCTTCCCCCTCGCCACCTACTGAACCCTCCTCCGAGGTGCCCGAGCAGCCGTCTGCCAG		462
S F P S P P T E P S S E V P E Q P S A Q		154
CCACTCCCTGGGAGTCCCCCAGAAGAGCCTATTACATCTACTCCGGGGGCGAGAAGATC		522
P L P G S P P R R A Y Y I Y S G G E K I		174
CCCCTGGTGTTGAGCCGGCCCCCTCTCTCCAACGTGGCCACTCTTCAGCATCTCTGTCGG		582
P L V L S R P L S S N V A T L Q H L C R		194
AAGACCGTCAACGGCCACCTGGACTCCTATGAGAAAGTCACCCAGCTGCCGGGGCCCATT		642
K T V N G H L D S Y E K V T Q L P G P I		214
CGGGAGTTCCTGGACCAGTACGATGCCCCGCTTTAA	gggggtaaagggcgcaaagggcatg	675
R E F L D Q Y D A P L *		225

← SOCS-3 3 rev

ggtcgggagaggggacgcaggccctctcctccgtggg

cacatggcacaagcacaagaagc

caaccaggagagagctcctgtagctctggggggaaagagggcggaacaggccctccct...

Genomische Struktur des *IRS1* Gens

Ausschnitt aus der Referenzsequenz des menschlichen Chromosoms 2 mit dem Datenbankeintrag NT_005403 (NCBI, Stand: August 2005). Die Nummerierung richtet sich nach dem Translationsstart ATG. Die Sequenz der verwendeten Primer ist unterstrichen.

```

...CAGCCCTTGCTGCACCCTCCAGAGCCCAAGAGCCCGGGGAATATGTCAATATTGAA 2700
  Q P L L H P P E P K S P G E Y V N I E 900
TTTGGGAGTGATCAGTCTGGCTACTTGTCTGGCCCGGTGGCTTTCCACAGCTCACCTTCT 2760
  F G S D Q S G Y L S G P V A F H S S P S 920
GTCAGGTGTCCATCCCAGCTCCAGCCAGCTCCCAGAGAGGAAGAGACTGGCACTGAGGAG 2820
  V R C P S Q L Q P A P R E E E T G T E E 940

                                rs1801278 for →
TACATGAAGATGGACCTGGGGCCGGGCCGGAGGGCAGCCTGGCAGGAGAGCACTGGGGTC 2880
  Y M K M D L G P G R R A A W Q E S T G V 960

                                G>A:Gly971Arg
GAGATGGGCAGACTGGGCCCTGCACCTCCCGGGGCTGCTAGCATTTGCAGGCCTACCCGG 2940
  E M G R L G P A P P G A A S I C R P T R 980
GCAGTGCCCAGCAGCCGGGGTGACTACATGACCATGCAGATGAGTTGTCCCCGTCAGAGC 3000
  A V P S S R G D Y M T M Q M S C P R Q S 1000
TACGTGGACACCTCGCCAGCTGCCCCTGTAAGCTATGCTGACATGCGAACAGGCATTGCT 3060
  Y V D T S P A A P V S Y A D M R T G I A 1020

← rs1801278 rev
GCAGAGGAGGTGAGCCTGCCAGGGCCACCATGGCTGCTGCCTCCTCATCCTCAGCAGCC 3120
  A E E V S L P R A T M A A A S S S S A A 1040
TCTGCTTCCCCGACTGGGCCTCAAGGGGCAGCAGAGCTGGCTGCCCCTCGTCCCTGCTG 3180
  S A S P T G P Q G A A E L A A H S S L L 1060
GGGGGCCCACAAGGACCTGGGGGCATGAGCGCCTTCACCCGGGTGAACCTCAGTCCTAAC 3240
  G G P Q G P G G M S A F T R V N L S P N 1080
CGCAACCAGAGTGCCAAAGTGATCCGTGCAGACCCACAAGGGTGCCGGCGGAGGCATAGC 3300
  R N Q S A K V I R A D P Q G C R R R H S 1100
TCCGAGACTTTCTCCTCAACACCCAGTGCCACCCGGGTGGGCAACACAGTGCCCTTTGGA 3360
  S E T F S S T P S A T R V G N T V P F G 1120
GCGGGGGCAGCAGTAGGGGGCGGTGGCGGTAGCAGCAGCAGCAGCGAGGATGTGAAACGC 3420
  A G A A V G G G G G S S S S S E D V K R 1140

```

-Sequenz wird auf der nächsten Seite fortgesetzt-

-Fortsetzung der Sequenz-

CACAGCTCTGCTTCCTTTGAGAATGTGTGGCTGAGGCCTGGGGAGCTTGGGGGAGCCCC	3480
H S S A S F E N V W L R P G E L G G A P	1160
AAGGAGCCAGCCAAACTGTGTGGGGCTGCTGGGGGTTTGGAGAATGGTCTTAACCTACATA	3540
K E P A K L C G A A G G L E N G L N Y I	1180
GACCTGGATTTGGTCAAGGACTTCAAACAGTGCCCTCAGGAGTGCACCCCTGAACCGCAG	3600
D L D L V K D F K Q C P Q E C T P E P Q	1200
CCTCCCCACCCCCACCCCTCATCAACCCCTGGGCAGCGGTGAGAGCAGCTCCACCCGC	3660
P P P P P P P H Q P L G S G E S S S T R	1220
CGCTCAAGTGAGGATTTAAGCGCCTATGCCAGCATCAGTTTCCAGAAGCAGCCAGAGGAC	3720
R S S E D L S A Y A S I S F Q K Q P E D	1240
CGTCAGTAG	3729
R Q *	1243

Genomische Struktur des *IRS2* Gens

Ausschnitt aus der Referenzsequenz des menschlichen Chromosoms 13 mit dem Datenbankeintrag NT_009952 (NCBI, Stand: August 2005). Die Nummerierung richtet sich nach dem Translationsstart ATG. Die Sequenz der verwendeten Primer ist unterstrichen.

...CCGGAGCCCAAGAGCCCCGGCGAGTACATCAACATCGACTTTGGCGAGCCCGGGGCC	2287
P E P K S P G E Y I N I D F G E P G A	929
CGCCTGTGCGCCCGCCGCGCCTCCCCTGCTGGCGTCGGCGGCCTCGTCCTCCTCGCTCTTG	2847
R L S P P A P P L L A S A A S S S S L L	949
TCCGCCAGCAGCCCGGCCTCGTCGCTGGGCTCAGGCACCCGGGCACCAGCAGCGACAGC	2907
S A S S P A S S L G S G T P G T S S D S	969

rs1805097 for →

CGGCAGCGGT <u>TCTCCGCTCTCCGACTACATGA</u> ACCTCGACTTCAGCTCCCCAAGTCTCCT	2967
R Q R S P L S D Y M N L D F S S P K S P	989
AAGCCGGGCGCCCCGAGCGGCCACCCCGTGGGCTCCTTGGACGGCCTCCTGTCCCCGAG	3027
K P G A P S G H P V G S L D G L L S P E	1009
GCCTCCTCCCCGTATCCGCCGTTGCCCCGCGTCCGTCCGCGTCCCCGTGTCGTCTCTG	3087
A S S P Y P P L P P R P S A S P S S S L	1029

-Sequenz wird auf der nächsten Seite fortgesetzt-

-Fortsetzung der Sequenz-

CAGCCGCGCCACCGCCGCGCGCCCGGGGAGCTGTACCGCCTGCCCCCGCCTCGGCC	3147
Q P P P P P P A P G E L Y R L P P A S A	1049
G>A:Gly1057Asp	
GTTGCCACCGCCCAGGGCCCCGGCGCCGCCTCATCGTTGTCCTCGGACACCGGGGACAAT	3207
V A T A Q G P G A A S S L S S D T G D N	1069
GGTGACTACACCGAGATGGCTTTTGGTGTGGCCGCCACCCGCGCAACCTATCGCGGCC	3267
G D Y T E M A F G V A A T P P Q P I A A	1089
CCCCGAAGCCAGAAGCTGCCCCGCGTGGCCAGCCCGACGTCGGGCGTGAAGAGGCTGAGC	3327
P P K P E A A R V A S P T S G V K R L S	1109
← rs1805097 rev	
CTCATGGAGCAGGTGTCGGGAGTCGAGGCCTTCCTGCAGGCCAGCCAGCCCCGGACCCC	3387
L M E Q V S G V E A F L Q A S Q P P D P	1129
CACCGCGGCGCCAAGGTCATCCGCGCAGACCCGCAGGGGGGCGCCGCCGCCACAGTTCC	3447
H R G A K V I R A D P Q G G R R R H S S	1149
GAGACCTTCTCCTCCACCACGACGGTCACCCCGTGTCCCCGTCTTCGCCCACAACCCC	3507
E T F S S T T T V T P V S P S F A H N P	1169
AAGCGCCACAACCTCGGCCTCCGTGGAATAATGTCTCTCTCAGGAAAAGCAGCGAGGGCGGC	3567
K R H N S A S V E N V S L R K S S E G G	1189
GTGGGTGTCGGCCCTGGAGGGGGCGACGAGCCGCCACCTCCCCACGACAGTTGCAGCCG	3627
V G V G P G G G D E P P T S P R Q L Q P	1209
GCGCCCCCTTTGGCACCGCAGGGCCGGCCGTGGACCCCGGGTCAGCCCGGGGGCTTGCTC	3687
A P P L A P Q G R P W T P G Q P G G L V	1229
GGTTGTCCTGGGAGCGGTGGATCGCCCATGCGCAGAGAGACCTCTGCCGGCTTCCAGAAT	3747
G C P G S G G S P M R R E T S A G F Q N	1249
GGTCTCAACTACATCGCCATCGACGTGAGGGAGGAGCCCGGGCTGCCACCCAGCCGCAG	3807
G L N Y I A I D V R E E P G L P P Q P Q	1269
CCGCCCGCCGCCGCTTCCTCAGCCGGGAGACAAGAGCTCCTGGGGCCGGACCCGAAGC	3867
P P P P P L P Q P G D K S S W G R T R S	1289
CTCGGGGGTCTCATCAGCGCTGTGGGCGTCGGCAGCACCGGCGGCGGGTGCGGGGGGCCG	3927
L G G L I S A V G V G S T G G G C G G P	1309
GGTCCCGGTGCCCTGCCCCCTGCCAACACCTACGCCAGCATTGACTTCTTGTCCCACCAC	3987
G P G A L P P A N T Y A S I D F L S H H	1329
TTGAAGGAGGCCACCATCGTGAAAGAGTGA	4014
L K E A T I V K E *	1338

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1	BMI-Perzentilenkurven für Mädchen im Alter bis 18 Jahren	3
Abb. 1-2	BMI-Verteilung in der Bevölkerung in Abhängigkeit von genetischer Prädisposition und Umwelteinflüssen	5
Abb. 1-3	Kontrolle der Energiehomöostase durch Neuronen des Hypothalamus	8
Abb. 1-4	Regulation der Nahrungsaufnahme durch periphere Signale	11
Abb. 1-5	Vom Leptin-Rezeptor ausgehende Signalwege	24
Abb. 2-1	Schematische Darstellung der SSCA	39
Abb. 2-2	Schematische Darstellung der Tetra-ARMS-PCR	45
Abb. 2-3	Konzeption der Primer-Extensionsreaktion und Analyse der Extensionsprodukte im Massenspektrometer	47
Abb. 2-4	Schematische Darstellung einer TDT-Analyse.	50
Abb. 3-1	SOCS-3 Genstruktur, Datenbank-SNPs und Primerpositionen zur Amplifikation der codierenden Region und des Minimalpromoters	55
Abb. 3-2	IRS-1 Genstruktur, Datenbank-SNPs und Primerpositionen zur Ampli- fikation des Genbereiches, der den SNP rs1801278 flankiert	56
Abb. 3-3	IRS-2 Genstruktur, Datenbank-SNPs und Primerpositionen zur Ampli- fikation des Genbereiches, der den SNP rs1805097 flankiert	57
Abb. 3-4	Überblick über die im Mutationsscreening identifizierten Sequenz- varianten in SOCS-3	59
Abb. 3-5	Ausschnitt aus SSCA-Gelen mit der Variante -1044C>A in SOCS-3	60
Abb. 3-6	Sequenzanalyse der Variante -1044C>A in SOCS-3	60
Abb. 3-7	Ausschnitt aus SSCA-Gelen mit der Variante -920C>A in SOCS-3	61
Abb. 3-8	Sequenzanalyse der Variante -920C>A in SOCS-3	61
Abb. 3-9	Ausschnitt aus SSCA-Gelen mit der Variante -985G>T in SOCS-3	62
Abb. 3-10	Sequenzanalyse der Variante -985G>T in SOCS-3	63
Abb. 3-11	Ausschnitt aus SSCA-Gelen mit der Variante -1037T>C in SOCS-3	63
Abb. 3-12	Sequenzanalyse der Variante -1037T>C in SOCS-3	64
Abb. 3-13	PCR-RFLP Genotypisierung der Variante -1044 C>A in SOCS-3	64
Abb. 3-14	Tetra-ARMS PCR zur Genotypisierung von -920C>A in SOCS-3	65
Abb. 3-15	PCR-RFLP Genotypisierung der IRS-1 Variante Arg972Gly	65

-Abbildungsverzeichnis wird auf der nächsten Seite fortgesetzt-

-Fortsetzung des Abbildungsverzeichnisses-

Abb. 3-16	Sequenzanalyse der verschiedenen Genotypen der Variante IRS-1 rs1801278 (Arg972Gly)	66
Abb. 3-17	PCR-RFLP Genotypisierung der IRS-2 Variante Gly1057Asp	67
Abb. 4-1	Schematische Darstellung des Leptin-Regelkreises	82
Abb. 4-2	Identifizierte SNPs und seltene genetische Varianten im Promoterbereich von SOCS-3	84
Abb. 4-3	Beteiligung der SOCS-3 Promoter-Elemente an der basalen bzw. Interleukin-6 induzierten Aktivierung der murinen SOCS-3 Expression	85
Abb. 4-4	cross-talk zwischen Leptin- und Insulin-Signalwegen	90
Abb. 4-5	Polygene Erkrankungen werden von vielen Genen mit unterschiedlichem Einfluss auf den Phänotyp verursacht	102

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1	Einteilung der Gewichtsklassen in Abhängigkeit vom BMI	2
Tabelle 1-2	Monogene Formen der Adipositas im Mausmodell	14
Tabelle 1-3	Monogene Formen der Adipositas beim Menschen	16
Tabelle 2-1	Deskriptive Statistiken der untersuchten Studiengruppen	29
Tabelle 2-2	Verwendete Puffer und Lösungen zur Isolierung genomischer DNA aus Blutproben	32
Tabelle 2-3	Verwendete PCR-Primer	34
Tabelle 2-4	Standard PCR-Bedingungen	35
Tabelle 2-5	Optimierte PCR- Bedingungen für die jeweiligen PCR-Fragmente	37
Tabelle 2-6	Restriktion der SOCS-3 PCR-Fragmente in geeignete Größen für die SSCA	40
Tabelle 2-7	Puffer und Lösungen zur Herstellung eines SSCA Gels	40
Tabelle 2-8	Optimale Bedingungen für das SSCA-Mutationsscreening	41
Tabelle 2-9	Verwendete Restriktionsenzyme für die RFLP-Analyse	44
Tabelle 2-10	Verwendete Tetra-ARMS Primer und Amplifikationsbedingungen	45
Tabelle 2-11	Schema einer Vierfeldertafel für den χ^2 -Test	49
Tabelle 2-12	Schema einer Vierfeldertafel für den TDT	51
Tabelle 2-13	Fehlersystematik im statistischen Test	52
Tabelle 3-1	Kopplungsbefunde von DNA-Markern im Bereich des SOCS-3 Locus mit Adipositas-assoziierten Phänotypen	54
Tabelle 3-2	Ausgewählte Datenbank-SNPs in Genen der Leptin-Signalkaskade	57
Tabelle 3-3	Assoziationsergebnisse, Allel- und Genotypfrequenzen der SOCS-3 Varianten -1044C>A und -920C>A	68
Tabelle 3-4	PDT-Analyse von -1044C>A im SOCS-3 Promoter	69
Tabelle 3-5	Allel- und Genotypfrequenzen der Varianten IRS-1 Arg972Gly und IRS-2 Gly1057Asp	70
Tabelle 3-6	Allel- und Genotypfrequenzen der Varianten in ausgewählten Kandidatengenen der Leptin-Signalkaskade	71
Tabelle 3-7	TDT-Analyse ausgewählter Kandidatengene der Leptin-Signalkaskade ..	77
Tabelle 4-1	Kriterien für die SNP-Auswahl hinsichtlich Lokalisation und funktionellem Effekt	99

Verwendete Abkürzungen

Für Mengen-, Größen-, Zeit- und andere physikalische Angaben wurden SI- bzw. gesetzliche Einheiten benutzt. Die Basen der Nukleinsäuren und die Aminosäuren wurden mit dem gebräuchlichen Einbuchstabencode abgekürzt. Alle weiteren verwendeten Abkürzungen sind nachfolgend aufgelistet.

Abkürzung	Bezeichnung
AgRP	<i>agouti related peptide</i>
<i>aqua bidest.</i>	bidestilliertes Wasser
ARC	Nucleus arcuatus
ARMS	allelspezifische Amplifikation (<i>amplification refractory mutation system</i>)
AS	Aminosäure
ATG	Startkodon (Alanin-Threonin-Glycin)
BMI	Körpermassenindex (<i>body mass index</i>)
bp	Basenpaare
CART	<i>cocaine- and amphetamine-regulated transcript</i>
CDS	kodierende Sequenz (<i>coding sequence</i>)
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
<i>db</i>	<i>diabetes</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alteri</i>)
for	<i>forward</i> , Vorwärtsprimer
G/C	Guanin-Cytosin
h	Stunde
HWG	Hardy-Weinberg Gleichgewicht
IRS	<i>Insulin Receptor substrates</i>
Jak	<i>Janus Kinase</i>
kb	Kilobasen
LD	Kopplungsungleichgewicht (<i>Linkage Disequilibrium</i>)
LHA	lateraler Hypothalamus
LOD	Maß für die Wahrscheinlichkeit der genetischen Kopplung zweier Loci (<i>logarithm of the odds</i>)

-Abkürzungstabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt-

-Fortsetzung der Abkürzungstabelle-

Abkürzung	Bezeichnung
LRb	Lange Isoform des Leptin-Rezeptors (LR)
MC4-R	Melanocortin-4-Rezeptor
MCH	Melanin-konzentrierendes Hormon
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
mt	Mutante
n	Stichprobenumfang
NPY	Neuropeptid Y
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>ob</i>	<i>obese</i>
p	Bezeichnung für den kurzen Arm eines Chromosoms
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDT	<i>Pedigree Transmission-Disequilibrium-Test</i>
PFA	Perforatorische Region
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PI3-K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
POMC	Pro-Opiomelanocortin
PVN	Nucleus paraventricularis
q	Bezeichnung für den langen Arm eines Chromosoms
QTL	<i>quantitative trait locus</i>
rev	<i>reverse</i> , Rückwärtsprimer
RFLP	Restriktionsfragment Längenpolymorphismus (<i>restriction fragment length Polymorphism</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur (22 °C)
SBE	<i>Stat Binding Element</i>
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
sek.	Sekunde

-Abkürzungstabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt-

-Fortsetzung der Abkürzungstabelle-

Abkürzung	Bezeichnung
SH2	<i>Src-like homology-2</i>
SNP	<i>single nucleotide Polymorphism</i>
SOCS	<i>Suppressor of Cytokine Signaling</i>
SSCA	Einzelstrang-Konformationsanalyse (<i>single-stranded conformation polymorphism analysis</i>)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	<i>untranslated region</i> (5'UTR, 3'UTR)
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VMH	ventromedialer Hypothalamus
wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

Verzeichnis der Groß- und Kleingeräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Autoklav 3850	Tuttnauer
Zentrifuge Biofuge 13/ Labfuge	Heraeus instruments (Hanau)
Drehschieberpumpe RZ-2	Vaccubrand (Gießen)
Plattenschwenkgerät Duomax 1030	Heidolph Instruments (Schwabach)
GDS-Kamerasystem	Polaroid (Offenbach)
DNA-Thermozykler Geneamp	
PCR-System 2400/9600	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Photometer Genequant II	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Horizontalelektrophorese GE-A2	AGS (Heidelberg)
Magnet- Rührgerät Ikamag RH	IKA Labortechnik (Staufen)
DNA- Gradientencycler JMBS 0.2 G	Hybaid (Heidelberg)
Kühlzentrifuge Megafuge 2.0	Heraeus instruments (Hanau)
Mikrowelle	Panasonic (Hamburg)
Milli-Qplus für aqua bidest	Millipore (Saint-Quentin Yvelines Codex, F)
Elektrische Saugpipette Pipetus-akku	HIRSchmann Laborgeräte (Eberstadt)
Stromaggregat Power-Supply E 452/E 734	Consort (Turnhout, Belgien)
Stromaggregat Power-Supply EPS 301	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Schüttelwasserbad 1083	GFL (Burgwedel)
Eismaschine Scotsman AP-10	Frimont (Mailand, Italien)
DNA- Thermozykler Touch Down	Hybaid, MWG (Ebersberg)
Trockner FunktionLine	Heraeus instruments (Hanau)
Ultra Low Freezer	New Brunswick Scientific(Nürtingen)
Eisschrank –80°C Unigel Dryer 4050	Uniequip (Martinsried/München)
Ultraviolett-Lichtquelle Mighty Bright	Hoefer (San Francisco, USA)
Vertikalelektrophorese SE 600 für SSCA	Hoefer (San Francisco, USA)
Schüttelgerät Vortex MS1, RS1	IKA Labortechnik (Staufen)
Waage SBA, SBC	ScalTec Instruments (Heiligenstadt)

Verwendete Puffer und Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
123-bp und 100-bp DNA-Längenmarker	Gibco BRL (Eggenstein)
Acrylamid/ Bis-Acrylamid (37,5:1)	Roth (Karlsruhe)
Agarose NEEO	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
<i>aqua ad injectabile</i> Ampuwa	Fresenius Kabi (Bad Homburg)
<i>aqua bidest.</i> / HPLC	Roth (Karlsruhe)
Borsäure	Roth (Karlsruhe)
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma (Deisenhofen)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Deisenhofen)
DNA- Polymerisationsmix (dNTP)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol abs. vergällt	Apotheke der Philipps-Universität Marburg
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Ethylen-diamin-tetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Pronase E	Sigma (Deisenhofen)
Restriktionspuffer	Sigma (Deisenhofen)
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN (Hilden)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Ipswich, GB)
Salpetersäure	Merck (Darmstadt)
Sodiumdodecylphosphat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Silbernitrat	Roth (Karlsruhe)
<i>Taq</i> -Polymerase	Sigma (Deisenhofen)
Tetra-methyl-ethylendiamin (TEMED)	Sigma (Deisenhofen)
Trishydroxymethylaminoethan (Tris)	Roth (Karlsruhe)
Xylenezyanolblau	Merck (Darmstadt)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst danke ich Herrn Professor Johannes Hebebrand für die Überlassung des interessanten Themas, die Möglichkeit zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten und die persönliche Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Anke Hinney für die Unterstützung und die Bereitschaft zu Problemlösungen und konstruktiven Diskussionen.

Frau Dr. Anne-Kathrin Wermter danke ich für hilfreiche Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit und für das sorgfältige Korrekturlesen des Manuskripts.

André Scherag und Thuy Trang Nguyen vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie in Marburg danke ich für die Hilfe bei der Auswertung der biometrischen Daten.

*Curriculum vitae***PERSÖNLICHE DATEN**

Name	Katja Hölter
Wohnort	Fronhausen
Geburtsdatum und -ort	29.03.1972 in Warstein

SCHULAUSBILDUNG

Städtisches Gymnasium, Meschede Allgemeine Hochschulreife	09.1988 - 06.1991
---	-------------------

BERUFSAUSBILDUNG

Höhere Berufsfachschule für technische Assistenten, Olsberg Biologisch-Technische Assistentin	09.1991 - 06.1993
--	-------------------

STUDIUM

Humanbiologie, Philipps-Universität Marburg Diplom Humanbiologin	10.1998 - 10.2003
Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg Approbation als Ärztin	03.2001 - 12.2005

BERUFSTÄTIGKEIT

Biologisch-technische Assistentin Institut für Botanik und allg. Mikrobiologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster	07.1993 - 10.1998
Assistenzärztin Klinik für Gynäkologie, gyn. Endokrinologie und Onkologie, Philipps-Universität Marburg	seit 04.2006

DISSERTATION

Klinik für Kinder-und Jugendpsychiatrie, Philipps-Universität Marburg Betreuer: Professor Dr. J. Hebebrand	01.2004 - 02.2007
--	-------------------